

Aus dem Labor für Tumorimmunologie,  
LIFE-Zentrum  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität  
Leiter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

**Untersuchungen zur Lokalisation und molekularen  
Interaktion von CEACAM16,  
einem hochkonservierten Mitglied der CEA-Familie**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Annegret Kamp  
aus Saarlouis

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. vet. Robert Kammerer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Stefan Endres PD Dr. med. Lars Lindner
Mitbetreuung durch den habilitierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	22.10.2015

Die Arbeit ist in folgende Publikation miteingeflossen:

**Loss of the mammal specific tectorial membrane component CEA cell adhesion molecule 16 (CEACAM16) leads to hearing impairment at low and high frequencies.**

Kammerer, R., Rüttiger, L., Riesenberger, R., Schäuble, C., Krupar, R., **Kamp, A.**, Sunami, K., Eisenried, A., Hennenberg, M., Grunert, F., Bress, A., Battaglia, S., Schrewe, H., Knipper, M., Schneider, M., Zimmermann, W. J Biol Chem, VOL. 287, NO. 26, pp. 21584 - 21598 June 22, 2012

Die Arbeit wurde auf folgendem wissenschaftlichen Kongress präsentiert:

Vortrag mit dem Thema

**"The inner-ear specific CEACAM16 probably acts as a dimeric ligand"**

auf dem

19<sup>th</sup> Annual International CEA Symposium, 15th - 18th Aug 2009, Essen / Bochum-Wattenscheid, Germany

Teile der Arbeit flossen in folgende Vorträge ein:

Rüttiger L., Kammerer R., Riesenberger R., Schäuble C., Krupar R., **Kamp A.**, Sunami K., Eisenried A., Hennenberg M., Grunert F., Breß A., Battaglia S., Schrewe H., Knipper M., Schneider M., Zimmermann W. Loss of Mammal-specific Tectorial Membrane Component Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 16 (CEACAM16) Leads to Hearing Impairment at Low and High Frequencies. Inner Ear Biology Workshop and Symposium, Tübingen, Germany, 29th Sep - 02nd Oct 2012

Schäuble C., Krupar R., **Kamp A.**, Riesenberger R., Grunert F., Sunami K., Rüttiger L., Knipper M., Schrewe H., Schneider M., Hennenberg M., Kammerer R., Zimmermann W., Targeted disruption of the CEA cell adhesion molecule 16 (Ceacam16) gene leads to morphological changes in the tectorial membrane and hearing impairment at low frequencies. 21th Annual International CEA Symposium, Konstanz, Germany, 18th - 21th Sep 2011

Zimmermann W., Hoffmann C., **Kamp A.**, Krupar R., Grunert F., Kammerer R., Evolutionary origins and possible functions of CEACAM16 and CEACAM20. 19th Annual International CEA Symposium, Essen, Germany, 15th - 18th Aug 2009



# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Physiologie des Hörens . . . . .	1
1.1.1	Anatomischer Aufbau des Innenohres . . . . .	1
1.1.2	Aufbau und Funktion des Corti-Organs . . . . .	1
1.1.3	Aufbau und Eigenschaften der Tektorialmembran . . . . .	3
1.2	Genetisch bedingte Schwerhörigkeit . . . . .	4
1.2.1	Nicht-syndromale hereditäre Hörstörungen . . . . .	5
1.3	Die Carcinoembryonale Antigen (CEA)-Familie . . . . .	9
1.4	Die CEACAM-Proteine . . . . .	9
1.4.1	Einteilung und Struktur . . . . .	9
1.4.2	Expression und Funktionen . . . . .	12
1.4.3	CEACAM16 . . . . .	15
1.5	Der DFNA4-Locus . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
3.1	Verbrauchsmaterialien . . . . .	21
3.2	Enzyme und Kits . . . . .	21
3.3	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	22
3.4	Geräte . . . . .	23
3.5	Immunhistologie . . . . .	25
3.6	Oligonukleotide . . . . .	25
3.7	Bakterien . . . . .	26
3.8	Zelllinien . . . . .	26
3.9	Gewebe . . . . .	26
3.10	Tierstämme . . . . .	27
3.11	RNA . . . . .	27
3.12	Verwendete Vektoren . . . . .	27
3.13	Software und Internetadressen . . . . .	27
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
4.1	Molekulargenetische Methoden . . . . .	28
4.1.1	Klonierung von Plasmiden . . . . .	28
	DNA-Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion . . . . .	28
	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	29
	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen . . . . .	30
	Konzentrationsbestimmung der DNA . . . . .	31

	Restriktionsendonukleaseverdau von DNA . . . . .	31
	Dephosphorylierung von DNA . . . . .	32
	DNA-Ligation . . . . .	32
	Transformation kompetenter Bakterien . . . . .	33
	Kolonie-PCR . . . . .	34
	Anlegen einer Bakterien-Dauerkultur . . . . .	35
	Plasmidpräparation . . . . .	35
	Überprüfung der Plasmide . . . . .	36
4.1.2	Expressionsanalysen . . . . .	36
	RNA-Isolierung . . . . .	36
	Überprüfung der Qualität der isolierten RNA . . . . .	36
	Reverse Transkription . . . . .	37
	Nachweis einer Genexpression durch PCR . . . . .	37
4.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	38
4.2.1	Auftauen von Zelldauerkulturen . . . . .	38
4.2.2	Kultur von semi-adhären HEK293T-Zellen . . . . .	38
4.2.3	Mykoplasmentest . . . . .	39
4.2.4	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	40
4.2.5	Anlegen einer Zelldauerkultur . . . . .	40
4.2.6	Transiente Transfektion . . . . .	41
4.2.7	Nachweis von thermostabiler alkalischen Phosphatase im Überstand transient transfizierter Zellen . . . . .	41
4.2.8	Anfertigung von Cytospins . . . . .	44
4.3	Histologie . . . . .	44
4.3.1	Gewebeentnahme . . . . .	44
4.3.2	Anfertigung histologischer Präparate paraffineingebetteter Gewebe . Fixierung und Entkalkifizierung der Gewebe . . . . . Entwässerung der Gewebeproben . . . . . Einbettung der Gewebe in einen Paraffinblock . . . . . Anfertigung von Paraffinschnitten . . . . .	45 45 45 46 47
4.3.3	Anfertigung von Gefrierschnitten . . . . .	47
4.3.4	Hämatoxin-Eosin-Färbung . . . . .	47
4.3.5	Immunhistologie und Immunzytologie . . . . . Vorbereitung der Gewebeschnitte . . . . . Färbung mit Hilfe des Mouse to Mouse IHC Detection System Kit . Färbung mit ImmPRESS®System . . . . . Färbung nach der Avidin-Biotin-Methode . . . . . Gegenfärbung und Eindeckeln der Präparate . . . . .	48 48 49 50 50 51
4.4	Nachweis des homophilen Interaktionspotentials von CEACAM16 (Zelladhäsionsmodell) . . . . .	51
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
5.1	Proteininteraktion von CEACAM16 . . . . .	53
5.1.1	Koexpression von CEACAM16 mit weiteren Mitgliedern der CEA-Familie . . . . .	53
5.2	Lokalisation des CEACAM16-Proteins . . . . .	56
5.2.1	Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 9D5 . . . . .	56

Umklonierung der humanen CEACAM16 cDNA . . . . .	56
Untersuchungen zur Spezifität des Anti-CEACAM16 Antikörpers 9D5 . . . . .	57
Eingrenzung des Bindungsepitops . . . . .	59
5.2.2 Nachweis des CEACAM16-Proteins im murinen Innenohr . . . . .	64
5.2.3 Nachweis des CEACAM16-Proteins im humanen Innenohr . . . . .	69
5.2.4 Untersuchung des CEACAM16-Proteins im murinen Kleinhirn . . . . .	70
5.3 Zelladhäsionsmodell zum Nachweis des homophilen Interaktionspotentials von CEACAM16 . . . . .	72
<b>6 Diskussion</b>	<b>76</b>
6.1 Proteininteraktionen von CEACAM16 . . . . .	76
6.2 Expression von CEACAM16 im zentralen Nervensystem . . . . .	78
6.3 Anfertigung von Gewebeschnitten muriner Innenohren . . . . .	80
6.4 Lokalisation und Expression von CEACAM16 in der Cochlea . . . . .	81
6.5 Mutationen im CEACAM16-Gen führen zu genetisch bedingter Taubheit . . . . .	85
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>Literatur</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>XVII</b>
<b>Danksagung</b>	<b>XX</b>





# 1 Einleitung

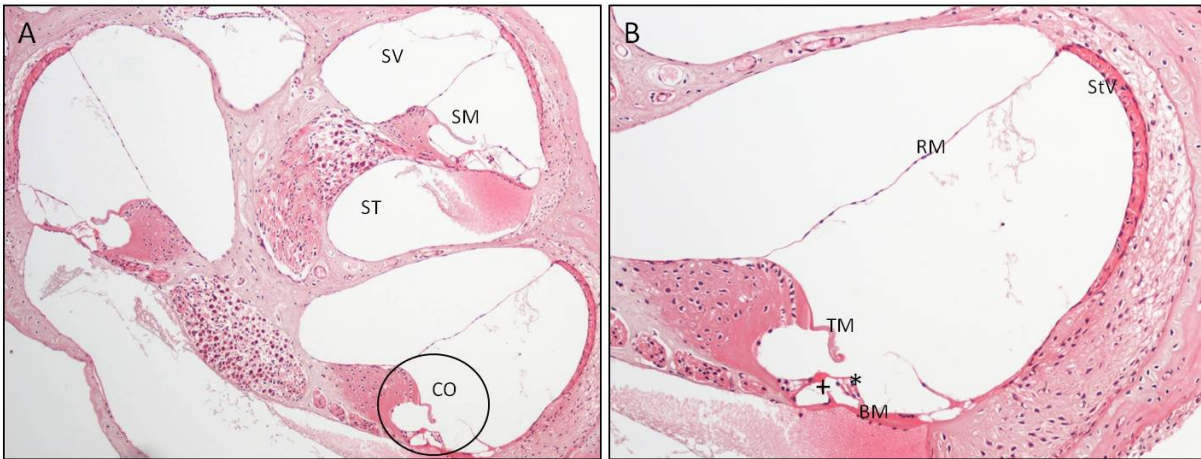
## 1.1 Physiologie des Hörens

### 1.1.1 Anatomischer Aufbau des Innenohres

Das Innenohr (Labyrinth), liegt eingebettet in das Felsenbein an der Schädelbasis (Lippert und Deller, 2003). Es lässt sich grob in zwei Untereinheiten unterteilen, welche jeweils einer unterschiedlichen Funktion dienen. Eine Untereinheit stellen die drei Bogengänge dar, welche das Gleichgewichtsorgan beherbergen. Die zweite Einheit ist die Schnecke (Cochlea), die das Hörorgan beherbergt. Beide bestehen aus einem äußeren knöchernen und dem inneren häutigen Anteil, zwischen denen sich der Perilymphraum befindet. Die Perilymphe ist eine dem *Liquor cerebrospinalis* ähnliche Flüssigkeit (Lawrence, 1982). Im Inneren des häutigen Labyrinthes liegt der Endolymphraum mit der kaliumreichen und natriumarmen Endolymphflüssigkeit. Gleichgewichtsorgan und Hörorgan stehen miteinander in Verbindung. Die Cochlea ist im Inneren durch zwei Membranen in drei Untereinheiten unterteilt. Die obere *Scala vestibuli* und die untere *Scala tympani* sind mit Perilymphe gefüllt und umschließen den *Ductus cochlearis*, welcher mit Endolymphe gefüllt ist und das Corti-Organ enthält. Die Reissner-Membran begrenzt den *Ductus cochlearis* nach oben zur *Scala vestibuli*, nach unten wird er durch die Basilarmembran von der *Scala tympani* abgegrenzt (Abb. 1.1A). Seitlich zum Knochen hin befindet sich das *Ligamentum spirale*, ein Fibrozytengeflecht, das die *Stria vascularis* trägt. Die Stria ist ein dreischichtiges Epithel und für die Sekretion der Endolymphe verantwortlich (Lüllmann-Rauch, 2003).

### 1.1.2 Aufbau und Funktion des Corti-Organes

Das Corti-Organ dient der Umwandlung von Schallsignalen in ein Aktionspotential im *Nervus cochlearis* durch Mechanotransduktion. Es besteht aus der Basilarmembran, der Tektorialmembran, den inneren und äußeren Haarzellen sowie den Stützzellen (Abb. 1.1B.)



**Abbildung 1.1: Anatomie der Cochlea.** Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbter histologischer Schnitt einer murinen Cochlea. (A) Aufbau der Cochlea mit drei Kompartimenten SV = scala vestibuli, SM = scala media, ST = scala tympani. Das Corti-Organ (CO) befindet sich in der SM. (B) Aufbau der scala media: RM = Reissner-Membran, StV = stria vascularis, TM = Tektorialmembran, BM = Basilar-membran, + = innere Haarzellen, \* = äußere Haarzellen.

Die inneren und äußeren Haarzellen liegen der Basilar-membran auf. Dabei stehen die inneren Haarzellen näher am *Limbus spiralis*, auf welchem die Tektorialmembran inseriert. Bei beiden Zellarten finden sich an der Zelloberfläche jeweils drei Stereozilien, die bei den äußeren Haarzellen mit ihren Spitzen bis an die Tektorialmembran heranreichen und dort binden (Lim, 1986; Dallos et al., 1972). Treffen Schallwellen auf das Trommelfell werden sie über die Gehörknöchelchenkette durch das Mittelohr weitergeleitet und über die Membran des ovalen Fensters auf die Perilymphe des Innenohres übertragen. Durch die in der Flüssigkeit entstehende Volumenverschiebung kommt es zur Auslenkung der Basilar-membran (v. Békésy, 1932). Es entsteht eine Wanderwelle, welche sich von der Basis bis zur Spitze der Schnecke (Helicotrema) ausbreitet. Die Lokalisation der maximalen Auslenkung der Membran ist dabei von der Frequenz des Schallreizes abhängig. Dieses Phänomen wird auch als Tonotopie der Basilar-membran bezeichnet. Bei hohen Frequenzen liegt das Maximum nah an der Basis der Cochlea, bei tieferen Frequenzen näher am Helicotrema (Raphael und Altschuler, 2003). Durch die Schwingung der Basilar-membran kommt es zu einer Verschiebung zwischen *Membrana reticularis*, einer netzartigen Struktur, welche von Ausläufern der Haarzellen und der Stützzellen des Corti-Organ gebildet wird (Iurato, 1967), und der Tektorialmembran (Ulfendahl und Flock, 1998; Hemmert et al., 2000), woraus eine Auslenkung der Haarbündel an der Spitze der Haarzellen resultiert (Zwislocki, 1986). Der folgende Vorgang wird allgemein als Mechanotransduktion

bezeichnet und beschreibt die Umwandlung eines mechanischen Reizes aus der Umwelt in ein elektronisches Signal (Marshall und Lumpkin, 2012; Gillespie und Walker, 2001). Die Haarbündel bestehen aus 30 bis 300 Stereozilien und einem randständigen Kinozilium. Die Auslenkung der Stereozilien in Richtung des Kinoziliums (bei einer Aufwärtsbewegung der Membran) führt zu einer direkten Öffnung der an den Spitzen befindlichen Transduktionskanäle über die *Tip-Links*, was zu einem Einstrom von Kalium- und Calciumionen aus der Endolympe in die Haarzellen und somit zur Depolarisation der Zelle führt (Assad et al., 1991; Hudspeth, 1985). Die äußeren Haarzellen reagieren mit einer prestinvermittelten Kontraktionsbewegung der Zellkörper und mit einer aktiven Bewegung der Haarbündel, woraus eine Verstärkung des Schallsignal innerhalb der Cochlea an der Stelle der höchsten Membranauslenkung resultiert (Zenner et al., 1985; Brownell et al., 1985; Preyer et al., 1994; Zheng et al., 2000; Ashmore, 2008; Pasqualetto et al., 2010). Bei den inneren Haarzellen führt die Depolarisation zur Signaltransduktion über Synapsen an der Zellbasis an Axone des Spiralganglions (Fettiplace und Hackney, 2006). Dieses Signal wird über die peripheren Fasern des *Nervus cochlearis* in Richtung des Gehirnes weitergeleitet, wo die Information im auditiven Cortex verarbeitet wird.

### 1.1.3 Aufbau und Eigenschaften der Tektorialmembran

Bei der Tektorialmembran handelt es sich um eine azelluläre Struktur aus Bindegewebe und Extrazellulärmatrix (Thalmann, 1993; Steel, 1983). Soweit bisher bekannt setzt sie sich aus den Kollagentypen II, V, IX und XI sowie den vier Proteinen  $\alpha$ -Tectorin,  $\beta$ -Tectorin, Otogelin und Otolin zusammen (Thalmann, 1993; Thalmann et al., 1993; Cohen-Salmon et al., 1997; Deans et al., 2010). Die letztgenannten vier Proteine zeigen jeweils ein innenohrspezifisches Expressionsmuster (Legan et al., 1997; Killick et al., 1995). Medial inseriert die Tektorialmembran am Spirallimbus in den Interdentalzellen, erstreckt sich über den Spiralsulcus und kommt lateral über dem Corti-Organ zu liegen, wo sie mit den Spitzen der äußeren Haarzellen verbunden ist (Richardson et al., 2008). Ihre Breite und Dicke variiert von der Spitze zur Basis der Cochlea stark. So füllt die Membran die *Scala media* auf Höhe des Apex nahezu aus und wird zur Basis hin dünner und schmaler (Naftalin et al., 1963). Auch die Steifigkeit der Membran variiert innerhalb des radiären und longitudinalen Verlaufs der Membran (Weaver und Schweitzer, 1994). Diese Unter-

schiede in der Beschaffenheit spielen eine herausragende Rolle bei ihrer aktiven Beteiligung an der Signaltransduktion (Ghaffari et al., 2007).

Die Bedeutung der Tektorialmembran für das Gehör wird durch die fatalen Folgen von Mutationen in den Genen, welche für ihre Bestandteile kodieren, deutlich.

## 1.2 Genetisch bedingte Schwerhörigkeit

Schwerhörigkeit ist die häufigste Störung der Sinnesorgane. Studien zeigen, dass über 19% der deutschen Bevölkerung über 14 Jahren keine normale Hörschwelle mehr aufweisen (Sohn, 2001). Man unterscheidet vier verschiedene Formen der Schallempfindungsschwerhörigkeit, die Schallleitungsschwerhörigkeit, die neurale Schwerhörigkeit und die zentrale Schwerhörigkeit. Diese sind jeweils auf verschiedene Ursachen zurückzuführen. Bei der Schallleitungsschwerhörigkeit ist die Ausbreitung des Schalles vor dem ovalen Fenster gestört. Ursachen hierfür können z.B. ein Erguss in der Paukenhöhle, eine traumatische Perforation des Trommelfelles, Entzündungen des Mittelohres oder die Verlegung des äußeren Gehörgangs sein. Bei der Schallempfindungsschwerhörigkeit ist die Umwandlung des Schallreizes in ein neuronales Signal im Innenohr gestört. Als Ursachen hierfür kommen unter anderem das akute Lärm-, Knall-, oder Explosionstrauma, die Presbyakusis (Altersschwerhörigkeit) und medikamentös-toxische, infektiöse oder idiopathische Schädigungen des Sinnesorgans in Frage. Bei der neuralen Schwerhörigkeit ist die Signalweiterleitung aus dem Innenohr ins zentrale Nervensystem durch eine Beeinträchtigung des Hörnervs, z.B. durch ein Akustikusneurinom, gestört. Zentrale Hörstörungen beruhen auf einem Defizit in der Weiterleitung bzw. Verarbeitung des ankommenden Reizes auf Höhe der Hörbahn bzw. der Hörrinde. Hierbei sind als ursächlich vor allem Hirninfarkte, Blutungen, Tumore oder eine Erkrankung wie Multiple Sklerose anzusehen (Zahnert, 2011). Es können also verschiedene äußere Faktoren dafür verantwortlich sein, dass es zu einer Schwerhörigkeit kommt.

Ebenso gibt es genetische Ursachen, welche zu einer Beeinträchtigung oder sogar dem Verlust des Hörvermögens führen (Bitner-Glindzicz, 2002). Man spricht in diesem Fall von genetisch bedingter, hereditärer Schwerhörigkeit. Diese kann auf einer Vielzahl von genetischen Alterationen beruhen und führt meist zu einer Schallempfindungsschwerhörigkeit. Nach ihrem Phänotyp lassen sich syndromale und nicht-syndromale angeborene

Hörstörungen unterscheiden. Eines von tausend Kindern wird mit einem Hördefekt geboren, wovon 50% genetisch bedingt sind (Nadol, 1993; Morton, 1991).

Syndromale Hörstörungen (SHL) treten im Rahmen von Syndromen auf und sind somit mit organischen Erkrankungen und Fehlbildungen wie z.B. okulären oder renalen Veränderungen vergesellschaftet. Die häufigste Ursache für SHL ist das Pendred-Syndrom, welches durch eine Mutation im SLC26A4-Gen ausgelöst wird. SLC26A4 kodiert für den Ionentransporter Pendrin und wird physiologisch in der Niere, der Schilddrüse und dem Innenohr exprimiert. Ein Defekt dieses Gens führt zu beidseitiger Schallempfindungsschwerhörigkeit durch Fehlbildung der Cochlea und Schilddrüsenfunktionsstörungen mit Entwicklung einer Struma (Kopp, 1999; Everett et al., 1997; Masindova et al., 2012). Weitere bekannte Beispiele wären das Usher-Syndrom und das Alport-Syndrom (Hone und Smith, 2001). SHL machen ca. 30% der vererbten Hörstörungen aus, werden zumeist autosomal-dominant vererbt (Birkenhager et al., 2007) und häufig durch Mutationen in mehreren Genen oder einem Gen mit breitem Expressionsmuster ausgelöst.

Nicht-syndromale Hörstörungen (NSHL) sind nicht mit systemischen Erkrankungen oder Organstörungen assoziiert und stellen mit ca. 70% die größere Gruppe der angeborenen genetischen Hörstörungen dar (Smith et al., 2005). Sie können autosomal-rezessiv (ca. 80%), autosomal-dominant (ca. 18%), x-chromosomal (ca. 2%) und in seltenen Fällen auch y-chromosomal und mitochondrial vererbt werden (Birkenhager et al., 2007; Angeli et al., 2012).

Zur Beschreibung des Phänotyps einer Hörstörung werden neben der Art der Hörstörung Kriterien wie das Manifestationsalter, der Verlauf, der betroffene Frequenzbereich und die Ausprägung des Hörverlustes (Hone und Smith, 2001; Noben-Trauth et al., 2003; Tekin et al., 2001) herangezogen.

### 1.2.1 Nicht-syndromale hereditäre Hörstörungen

Man geht davon aus, dass vor allem selektiv im Innenohr exprimierte Gene zu NSHL führen. Inzwischen gibt es aber auch einige Beispiele für weitverbreitet exprimierte Gene, die bei Vorliegen einer speziellen Mutation, zu NSHL führen. Hierzu gehören Tricellulin, Protocadherin15 und Gamma-actin (Ahmed et al., 2011). Die Benennung der NSHL-Loci erfolgt anhand der Vererbung der ihnen zugrunde liegenden Gendefekte (Mazzol et al.,

2003). So beginnen die Benennungen der autosomal-dominanten Genloci mit DFNA, autosomal-rezessiven Loci mit DFNB und x-chromosomal vererbten Genorte mit DFNX. Es folgen jeweils Zahlen, die in chronologischer Reihenfolge vergeben werden. Tabelle 1.1 und Tabelle 1.2 zeigen jeweils eine Übersicht über die DFNA- bzw. DFNB-Loci, die dazugehörigen Gene und deren Genprodukt. Es wurden nur die Loci aufgelistet, für welche bereits ein Gen identifiziert wurde. Meist führt bereits eine einzelnen Mutation zur Störung. Es handelt sich also um monogenetische Effekte. Nur in seltenen Fällen führt erst die Koinzidenz von zwei oder mehr Defekten zum Hörverlust. Für manche Gene sind mehrere Mutationen beschrieben und somit mehrere Loci zugeordnet. Für die Genloci besteht genetische Heterogenität, was bedeutet, dass unterschiedliche Gene innerhalb des Locus mutiert sein können.

Die Genprodukte der Loci sind sehr unterschiedlich. So handelt es sich beispielsweise um Ionenkanäle, Membranproteine zur Zelladhäsion, Transkriptionsfaktoren, Bestandteile des Zytoskeletts, extrazelluläre Matrixproteine und Strukturproteine (Birkenhager et al., 2007). In den Tabellen sind die Funktionen der Proteine aufgelistet, wobei für einige die genaue Funktion noch nicht bekannt ist.

Ungefähr die Hälfte aller von NSHL betroffenen Patienten zeigt eine Veränderung im GJB2-Gen, wobei 90 unterschiedliche Mutationen nachgewiesen wurden (Kelsell et al., 1997; Martinez et al., 2009; Ballana et al., 2013). Das betroffene Gen kodiert für Connexin26, einem Protein aus der Familie der *gap junction*-Proteine. In der Cochlea sind *gap junctions* an der Zirkulation der Kaliumionen zur Aufrechterhaltung des Potentialunterschiedes zwischen Peri- und Endolymphe, welcher essentiell für die Signaltransduktion ist, beteiligt (Kikuchi et al., 2000; Hibino und Kurachi, 2006). Das COL11A2-Gen kodiert für Kollagentyp XI-alpha2, welches ein wichtiger Bestandteil des Kollagengerüsts der Tektorialmembran ist. Mutationen des Gens führen sowohl zu autosomal-dominant (DFNA13) als auch zu autosomal-rezessiv (DFNB53) vererbter nicht-syndromischer Taubheit (Chen et al., 2005; McGuirt et al., 1999). Weitere Komponenten der Tektorialmembran können ebenfalls von Mutationen betroffen sein.  $\alpha$ -Tectorin ist neben den Kollagenfasern ein Hauptbestandteil der Tektorialmembran. Die Taubheitsloci DFNA8, DFNA12 und DFNB21 beschreiben jeweils Mutationen in dem für dieses Protein kodierendenTECTA-Gen (Hildebrand et al., 2011; Verhoeven et al., 1998; Mustapha et al., 1999).

Neben den beschriebenen Gruppen der Ionenkanäle und Strukturproteine sind häufig die Bestandteile des Zytoskeletts oder Proteine mit einer Rolle bei der Signaltransduktion von Mutationen betroffen.

**Tabelle 1.1: Genloci welche zu autosomal-dominant vererbter nicht-syndromischer Taubheit führen, deren Gen und dessen Produkt bekannt sind.** ((Van Camp und Smith, 2013) modifiziert nach NCBI Gene-Database (<http://ncbi.nlm.nih.gov/gene>))

Locus	Gen	Protein	Funktion
DFNA1	DIAPH1	protein diaphanous homolog 1	Haarzellfunktion
DFNA2	KCNQ4	KCNQ4	Ionentransport
DFNA3A	GJB2	Connexin 26	Ionentransport
DFNA3B	GJB6	Connexin 30	Ionentransport
DFNA4	MYH14	Nicht-Muskel Myosin 14	Zytoskelett
DFNA5	DFNA5	non-syndromic hearing impairment protein 5	unbekannt
DFNA6/14/38	WFS1	Wolframin	Signaltransduktion
DFNA8/12	TECTA	Alpha-Tectorin	Strukturell
DFNA9	COCH	cochlin	Strukturell
DFNA10	EYA4	eyes absent homolog 4	Transkriptionsfaktor
DFNA11	MYO7A	Myosin 7A	Zytoskelett
DFNA13	COL11A2	Kollagen 11 alpha 2	Strukturell
DFNA15	POU4F3	POU domain class 4 transcription factor 3	Transkriptionsfaktor
DFNA17	MYH9	nicht-Muskel Myosin 9	Zytoskelett
DFNA20/26	ACTG1	Gamma-actin	Zytoskelett
DFNA22	MYH6	Myosin 6	Zytoskelett
DFNA25	SLC17A8	Glutamattransporter 3	Signaltransduktion
DFNA28	GRHL2	grainyhead-like protein 2 homolog	Transkriptionsfaktor
DFNA36	TMC1	transmembrane channel-like protein 1	Ionentransport
DFNA44	CCDC50	Ymer	Transkriptionsfaktor
DFNA48	MYO1A	Myosin 1A	Zytoskelett
DFNA51	TJP2	tight junction protein ZO-2	Adhäsion
DFNA64	DIABLO	diablo homolog, mitochondrial	Apoptose

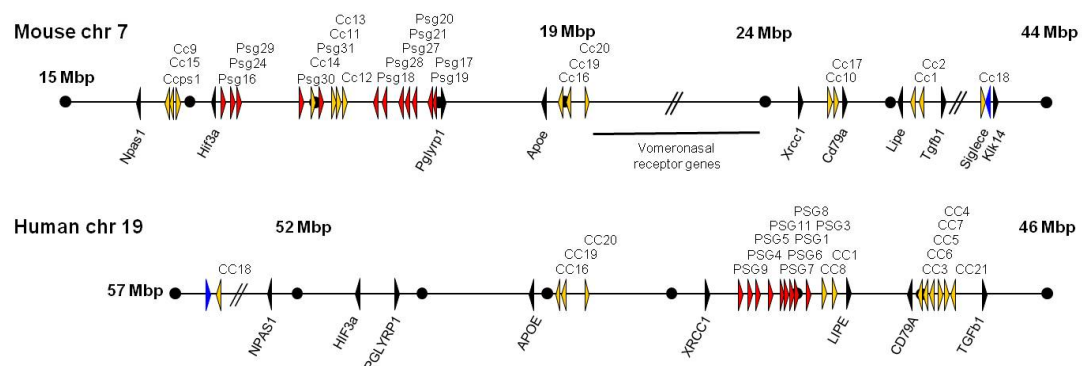
**Tabelle 1.2: Genloci welche zu autosomal-rezessiv vererbter nicht-syndromischer Taubheit führen, deren Gen und dessen Produkt bekannt sind.** ((Van Camp und Smith, 2013) modifiziert nach NCBI Gene-Database (<http://ncbi.nlm.nih.gov/gene>))

Locus	Gen	Protein	Funktion
DFNB1	GJB2	Connexin 26	Ionentransport
DFNB2	MYO7A	Myosin 7A	Zytoskelett
DFNB3	MYO15A	Myosin 15A	Zytoskelett
DFNB4	SCL26A4	Pendrin	Ionentransport
DFNB6	TMIE	TM inner ear expressed protein	Signaltransduktion
DFNB7/11	TMC1	TM channel-like protein 1	Ionentransport
DFNB8/10	TMPRSS3	TM protease serine 3	Signaltransduktion
DFNB9	OTOF	Otoferlin	Signaltransduktion
DFNB12	CDH23	Cadherin 23 (Otocadherin)	Haarzellfunktion
DFNB15/72/95	GIPC3	PDZ domain-containing protein GIPC3	Haarzellfunktion
DFNB16	STRC	Stereocilin	Strukturell
DFNB18	USH1C	Harmonin	Haarzellfunktion
DFNB21	TECTA	Alpha-Tectorin	Strukturprotein
DFNB22	OTOA	Otoancorin	Haarzellfunktion
DFNB23	PCDH15	Protocadherin15	Haarzellfunktion
DFNB24	RDX	Radixin	Zytoskelett
DFNB25	GRXCR1	GRXCR protein 1	Haarzellfunktion
DFNB28	TRIOBP	TRIO binding protein	Zytoskelett
DFNB29	CLDN14	tight junction claudin-14	Adhäsion
DFNB30	MYO3A	Myosin 3 A	Zytoskelett
DFNB31	WHRN	Whirlin	Zytoskelett
DFNB32/82	GPSM2	G-protein-signaling modulator 2	Zellpolarität
DFNB35	ESRRB	steroid hormone receptor ERR2	Innenohrentwicklung
DFNB36	ESPN	Espin	Strukturell
DFNB37	MYO6	Myosin 6	Zytoskelett
DFNB39	HGF	hepatocyte growth factor	Signaltransduktion
DFNB42	ILDR1	Ig-like domain-containing receptor 1	Signaltransduktion
DFNB49	MARVELD2	Tricellulin	Adhäsion
DFNB53	COL11A2	Kollagen 11 alpha 2	Strukturell
DFNB59	PJKV	Pejvakin	Signaltransduktion
DFNB61	SLC26A5	Prestin	Haarzellfunktion
DFNB63	LRTOMT	LRTOMT2	Signaltransduktion
DFNB66/67	LHFPL5	tetraspan membrane protein of hair cell stereocilia	Haarzellfunktion
DFNB73	BSND	Barttin	Ionentransport
DFNB74	MSRB3	methionine-R-sulfoxide reductase B3	Zellreparatur
DFNB77	LOXHD1	lipoygenase homology domain-containing protein 1	Haarzellfunktion
DFNB79	TPRN	Taperin	Haarzellfunktion
DFNB84	PTPRQ	phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ	Signaltransduktion
DFNB91	SERPINB6	Serpin B6	Zellprotektion



## 1.3 Die Carcinoembryonale Antigen (CEA)-Familie

Bei der Carcinoembryonalen Antigen (CEA)-Familie handelt es sich um eine Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie (Williams und Barclay, 1988). Die kodierenden Sequenzen beim Menschen befinden sich in einem Gen-Cluster, der sich über 1,8 Mb erstreckt, auf dem langen Arm von Chromosom 19 im Bereich 19q13.1-19q13.2 (Zimmermann et al., 1988; Olsen et al., 1994; Thompson et al., 1992). Bei der Maus findet man ein entsprechendes Gen-Cluster auf einem syntenen Genabschnitt mit einer Größe von 6,5 Mb auf Chromosom 7 (Rudert et al., 1992; Saunders und Seldin, 1990a,b). Man unterscheidet die CEA-ähnlichen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle CEACAM (carcinoembryonic antigen-related cell-cell adhesion molecules) sowie die schwangerschaftsspezifischen Glykoproteine PSG (pregnancy-specific glycoproteins) (Beauchemin et al., 1999). Die PSG werden physiologisch von der Plazenta während der Schwangerschaft exprimiert, können jedoch auch im Rahmen von Erkrankungen wie z.B. dem Chorionkarzinom, welches aus placentarem Gewebe entsteht, auftreten (Leslie et al., 1990; Bebo und Dveksler, 2005).



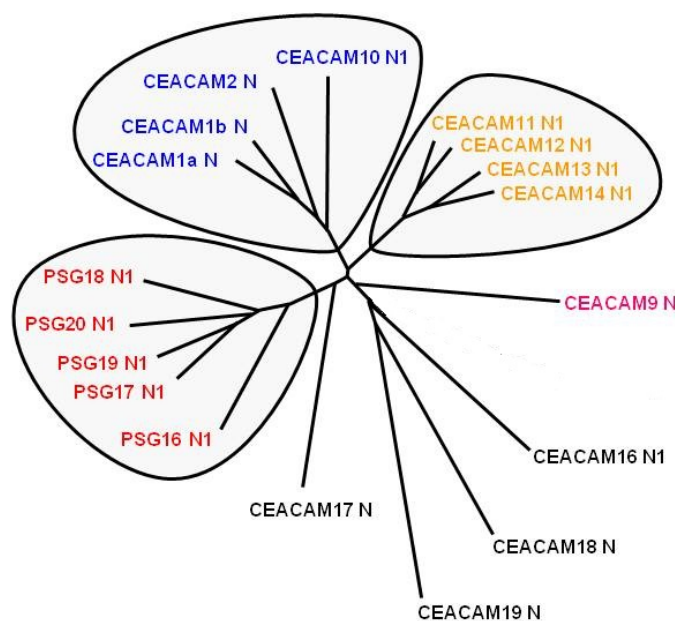
**Abbildung 1.2: Vergleichende Darstellung der CEA-Genfamilie im murinen und humanen Genom.** Die unterschiedlichen Gene sind als Pfeilspitzen, welche in die Leserichtung des Gens zeigen, dargestellt. Rote Pfeilspitzen symbolisieren PSG-Gene, gelbe Pfeile CEACAM-Gene. Durch schwarze Pfeilspitzen sind Gene symbolisiert, welche nicht zur CEA-Familie gehören und als Marker fungieren.

## 1.4 Die CEACAM-Proteine

### 1.4.1 Einteilung und Struktur

In den unterschiedlichen Spezies unterscheidet sich die Anzahl der CEACAM-Proteine deutlich, jedoch lassen sie sich grundsätzlich in zwei Gruppen einteilen: Zum einen fünf sehr unterschiedliche CEACAMs (CEACAM1, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19

und CEACAM20), von denen angenommen wird, dass sie die ursprünglichen CEACAM-Proteine sind und für welche bei unterschiedlichen Säugern orthologe Gene gefunden wurden; zum anderen eine variable Anzahl von Proteinen, welche dem CEACAM1 der jeweiligen Spezies ähnlich sind (Kammerer und Zimmermann, 2010). Besonders wenn man die Aminosäuresequenz der N1-Domänen der unterschiedlichen CEA-Familienmitglieder fällt die verwandschaftliche Entfernung von CEACAM16, CEACAM18 und CEACAM19 zu den anderen Mitgliedern der CEA-Familie auf (Abb. 1.3).

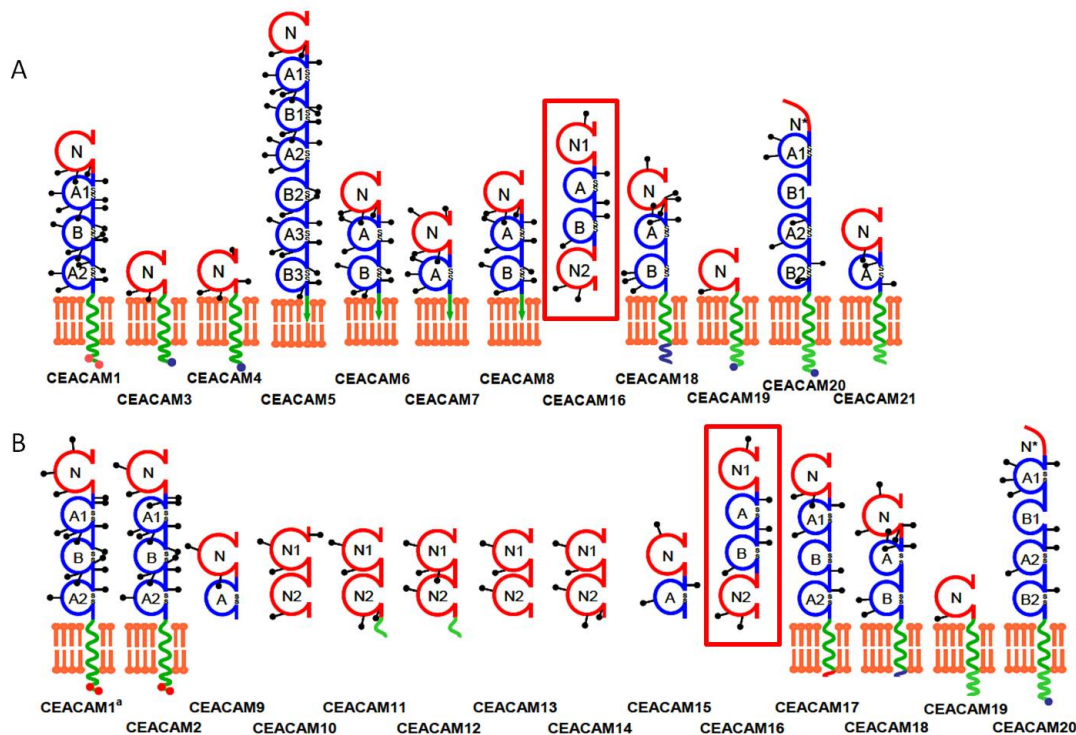


**Abbildung 1.3: Verwandtschaft der N1-Domänen der murinen CEA-Familienmitglieder.** Die Aminosäuresequenzen der N1-Domäne wurden mittels Alignment miteinander verglichen, als Dendrogramm dargestellt und in Gruppen eingeteilt. CEACAM1-ähnliche CEACAMs sind blau, die PSGs rot, das trophoblastenspezifische CEACAM9 pink, die CEACAM11-ähnlichen Gene gelb und die orthologen CEACAMs schwarz dargestellt. Da CEACAM20 nur über eine unvollständige N1-Domäne verfügt, wurde dieses nicht in die Untersuchung miteinbezogen (Zebhauser et al., 2005).

Bei der Betrachtung der Aminosäuresequenzen der CEACAM-Proteine findet man strukturelle Gemeinsamkeiten. Sie bestehen aus mindestens einer etwa 108 Aminosäuren großen Domäne am N-Terminus, welche homolog zur variablen Domäne der Immunglobuline ist (IgV-ähnlichen Domäne), und aus 0 bis 6 Domänen mit einer Größe von etwa 93 (Typ A) bzw. etwa 85 (Typ B) Aminosäuren, welche zu den konstanten Domänen des C2-Typs homolog sind (IgC2-ähnlichen Domänen) (Hammarstrom, 1999). Unterschiedliche Spezies weisen jedoch verschiedene Besonderheiten auf. Die humanen CEACAMs besitzen abgesehen von CEACAM16 alle, nur eine IgV-ähnliche Domäne.

Einige murinen Proteinen verfügen hingegen über zwei IgV-ähnliche Domänen (CEACAM10-CEACAM14, CEACAM16). Eine weitere Ausnahme bildet das murine CEACAM20, welches nur eine unvollständige IgV-ähnliche Domäne besitzt und hauptsächlich aus vier IgC2-ähnlichen Domänen (jeweils zwei vom A- und B-Typ) aufgebaut ist. Bei den PSGs zeigen sich im Aufbau große Unterschiede zwischen den Spezies. Die humanen PSGs folgen dabei ähnlichen Prinzipien wie die humanen CEACAMs. Die murinen PSGs bestehen hingegen aus bis zu sieben IgV-ähnlichen und nur einer IgC2-ähnlichen Domäne (McLellan et al., 2005; Teglund et al., 1995).

Hinsichtlich ihrer Assoziation mit der Zellmembran verhalten sich die CEACAM-Proteine in dreierlei Weise. Einige Mitglieder sind über eine Transmembrandomäne in die Membran integriert. Häufig weisen diese an ihrer cytoplasmatischen Domäne ein immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif (ITIM), ein immunoreceptor tyrosin-based switch motif (ITSM), ein immunorezeptor tyrosin-based activation motif (ITAM) oder ein ITAM-ähnliches Motiv auf, um ihre Funktion intrazellulär zu vermitteln (Obrink, 1997). Beispiele für ITIM tragende Proteine sind das humane und das murine CEACAM1 (Chen et al., 2001). Ein ITAM findet man unter anderem bei CEACAM20. Die humanen CEACAM3, CEACAM4 und CEACAM19 weisen ITAM ähnliche Motive auf (Schmitter et al., 2004; Zebhauser et al., 2005; Kammerer und Zimmermann, 2010). Eine weitere Form der Membranverankerung findet sich bei den humanen CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8. Diese sind über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) mit der Zellmembran verbunden. Die sezernierten Proteine bilden die dritte Gruppe. Zu dieser Gruppe gehören die murinen CEACAM9 - CEACAM15, sowie das in allen Säugern vorkommende CEACAM16. Ebenso sind alle PSGs sezernierte Proteine (Thompson et al., 1991). Abbildung 1.4 zeigt eine Übersicht über die Mitglieder der humanen und der murinen CEACAM-Familie.



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der CEA-Familienmitglieder beim Menschen (A) und bei der Maus (B). Die IgV-ähnlichen Domänen (N) sind rot, die IgC-ähnlichen Domänen blau dargestellt. Die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten der IgC-ähnlichen Domänen mit (S-S) bezeichnet. Konsensussequenzen für potenzielle N-Glykosylierungsstellen sind als gestielte Punkte dargestellt. Die Membranassoziation ist entweder durch eine geschwängelte Linie für eine Transmembrandomäne oder einen grünen Pfeil für einen GPI-Anker veranschaulicht. Befindet sich an der zytoplasmatischen Domäne ein ITAM oder ITAM-ähnliches Motiv, so ist dies als blauer Punkt markiert. Rote Punkte stehen für ITIMs. Das CEACAM16 ist durch eine rote Umrahmung hervorgehoben. Die PSG wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. (Quelle: the carcinoembryonic antigen homepage (Zimmermann, 2015))

### 1.4.2 Expression und Funktionen

Die Mitglieder der CEACAM-Familie sind bezüglich ihres Expressionsmusters und ihrer Funktionen sehr heterogen. Das wohl bekannteste Mitglied CEACAM5, häufiger als CEA bezeichnet, ist ein stark glykosyliertes Protein der Zelloberfläche. Dieses spielt in der klinischen Medizin eine wichtige Rolle als Tumormarker bei Adenokarzinomen (Ballesta et al., 1995). Es wird in epithelialen Geweben, wie der Zunge, der Trachealschleimhaut, dem gastrooesophagealen Übergang, dem Pylorus, im oberen Duodenum, dem Dickdarm und dem Appendix exprimiert (Nap et al., 1988). Unter physiologischen Bedingungen gelangt CEA nur in geringen Mengen ins Blut, da es an der zum Lumen gewandten Seite der Enterozyten lokalisiert ist und über den Stuhl ausgeschieden wird. Bei Tumorerkrankungen verlieren die Zellen ihre Polarität und die Proteine sind an der gesamten

Zelloberfläche zu finden. Auf diesem Wege erhalten sie Anschluss an das Lymph- und Blutgefäßsystem und können ins Blut gelangen. Dabei korreliert die Menge an CEA im Blut mit der Größe des Tumors (Hammarstrom, 1999). Funktionell dient es der kalziumunabhängigen Zelladhäsion (Benchimol et al., 1989) und ist an der Tumorsuppressorfunktion von CEACAM1 im kolorektalen Karzinom beteiligt. CEACAM1 induziert Apoptosevorgänge in Dickdarmepithelzellen (Nittka et al., 2004). CEA bewirkt eine Aktivierung der CEACAM1-vermittelten Apoptose (Nittka et al., 2008). Bei der Karzinogenese kommt es zu einer Herabregulation der CEACAM1-Expression, wodurch eine ungehemmte Proliferation ermöglicht wird. Im Gegensatz dazu wird CEA in epithelialen Tumoren überexprimiert (Ilantzis et al., 1997). Diese Überexpression führt zur Behinderung der Zelldifferenzierung, einer Blockierung der Anoikis-vermittelten Apoptose und zur Störung der Zellpolarisierung und damit der Gewebearchitektur (Eidelman et al., 1993; Screaton et al., 1997; Ilantzis et al., 1997; Ordonez et al., 2000; Ilantzis et al., 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird versucht eine tumorspezifische Therapie durch eine Impfung gegen CEA, welche im Anschluss eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort auslöst, zu entwickeln (Turriziani et al., 2012). Neben seiner Interaktion mit CEA bei der Tumorentstehung erfüllt CEACAM1 eine Vielzahl unterschiedlichster Funktionen, wozu es eines breiten Expressionsmusters bedarf. Unter anderem spielt CEACAM1 eine Rolle bei der Regulation des Immunsystems, der Granulopoese, der Angiogenese, als Tumorsuppressorgen bei der Entstehung unterschiedlicher Karzinome, der Ausbreitung von bakteriellen Infektionen sowie der Verstoffwechselung von Glukose und Fett über die Beeinflussung der Insulinwirkung (Neumaier et al., 1993; Ergun et al., 2000; Han et al., 2001; Kammerer et al., 2001; Najjar, 2002; Kuespert et al., 2006; Hauck et al., 2006; Leung et al., 2008; Pan und Shively, 2010). Weitere Mitglieder der CEACAM-Familie, welche eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielen, sind CEACAM7 und CEACAM6. Physiologisch kommen diese in der Glykokalix des Dickdarmgewebes vor (Scholzel et al., 2000; Ou et al., 2009; Frängsmyr et al., 1999). CEACAM6 wird darüber hinaus noch von zahlreichen weiteren epithelialen Geweben exprimiert (Chapin et al., 2012). Wie beim CEA findet man eine Überexpression von CEACAM6 in kolorektalen Karzinomen. Auch seine funktionelle Rolle bei der Kanzerogenese scheint ähnlich zu sein (Ilantzis et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist die Expression von CEACAM7 in kolorektalen Karzinomen

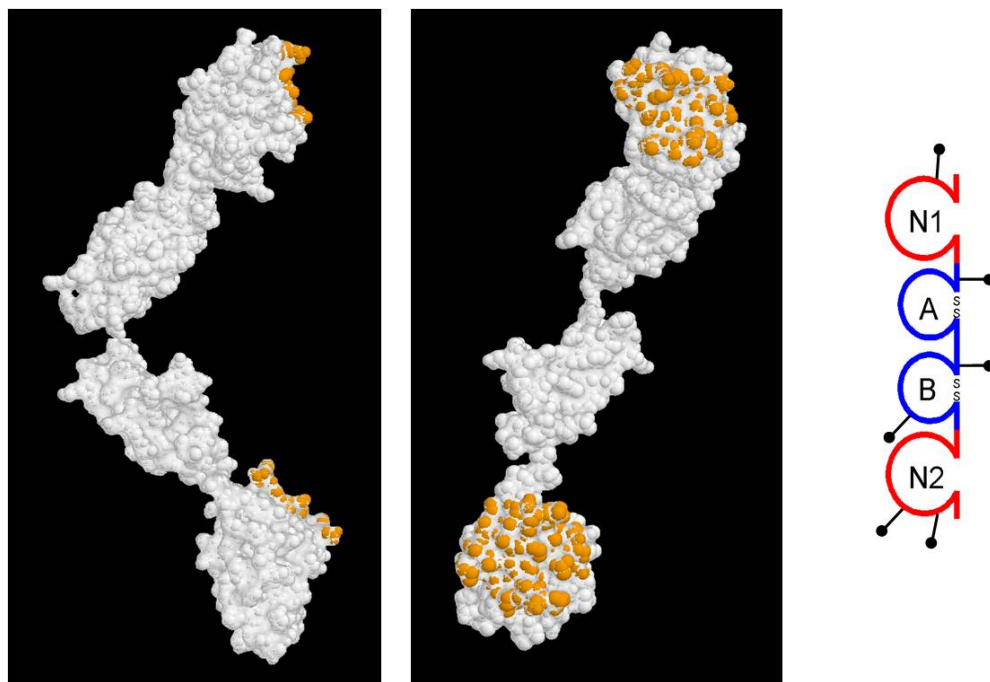
vermindert und das Ausmaß der Herunterregulation stellt nach neueren Hypothesen einen prädiktiven Marker für das Auftreten eines Rezidives dar (Thompson et al., 1994; Messick et al., 2010). Beim Magenkarzinom findet man im Gegensatz dazu eine Überexpression von CEACAM7 in Verbindung mit einer Überexpression von CEA bei schlecht differenzierten Tumoren mit schlechterer Prognose (Zhou et al., 2011).

Andere Mitglieder der Proteinfamilie werden ausschließlich in bestimmten Geweben exprimiert und üben dort hochspezialisierte Funktionen aus. Ein Beispiel hierfür ist CEACAM3, welches nur in humanen Granulozyten vorkommt und dort eine Rolle bei der Phagozytose von Bakterien spielt (Hauck et al., 1998; Nagel et al., 1993; Chen und Gotschlich, 1996; McCaw et al., 2003; Pils et al., 2008; Kuespert et al., 2006; Sarantis und Gray-Owen, 2007). Weitere Beispiele für ein limitiertes Vorkommen sind die murinen CEACAM9, CEACAM11, CEACAM12, CEACAM13, CEACAM14 und CEACAM15, deren Expression ausschließlich in der Plazenta nachgewiesen wurde (Zebhauser et al., 2005; Kataoka et al., 2000).

Von den bereits oben erwähnten orthologen CEACAM-Genen ist CEACAM20 das am intensivsten untersuchte. Seine Expression wurde in größeren Mengen in Dünndarm, Dickdarm und Hoden und in geringeren Mengen in Thymus, Speicheldrüse, Ovar, Brustdrüse und Prostata nachgewiesen. Darüber hinaus zeigte sich, eine deutliche Expression in Magen-, Prostata- und Brusttumoren, wobei angenommen werden muss, dass es sich hierbei um eine Hochregulation der Expression im Tumor handelt (Zebhauser et al., 2005; Eisenried, 2009). CEACAM20 interagiert mit der Milz-Tyrosinkinase (*spleen tyrosin kinase*, SYK), welche in einer ITAM-vermittelten Signaltransduktionskaskade eine Rolle in der Onkogenese verschiedener Tumore spielt (Paptistella, 2009). Auch für CEACAM19 konnte kürzlich eine Tumorassoziation nachgewiesen werden. In Mammakarzinomen finden sich signifikant höhere Expressionslevel für CEACAM19 als im Normalgewebe (Michaelidou et al., 2013). Ein weiteres Mitglied dieser Subgruppe ist CEACAM16, welches ein sehr eingeschränktes Expressionsmuster besitzt und dessen Funktion bisher noch nicht verstanden ist.

### 1.4.3 CEACAM16

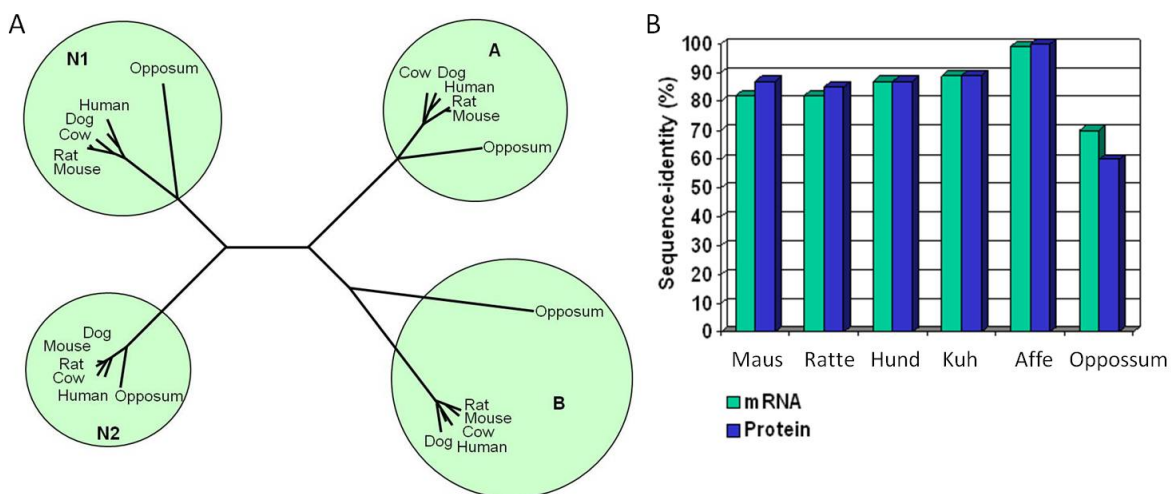
CEACAM16 gehört, wie neun weitere Gene in der Maus, zu den erst vor Kurzem entdeckten Mitgliedern der CEA-Familie und wurde 2005 erstmals von Zebhauser et al. beschrieben. Darüber hinaus gehört es zur Gruppe der fünf CEACAMs, für die im humanen und murinen Genom orthologe Gene existieren. Sowohl das humane als auch das murine Protein zeigen eine Struktur aus vier Domänen. Es handelt sich dabei um 2 IgV-ähnliche Domänen N1 und N2, sowie zwei IgC2-ähnliche Domänen, jeweils eine vom Typ A und eine vom Typ B (Abb. 1.5). Dieser Struktur geht in der Aminosäuresequenz eine Signalsequenz voraus, welche der Markierung des Proteins zur Einschleusung in das endoplasmatische Reticulum dient. Da CEACAM16 keine Transmembrandomäne aufweist, scheint eine Bindung an die Zellmembran unwahrscheinlich. Das fertige Protein besitzt 6 potenzielle N-Glykosylierungsstellen, welche sich auf den unterschiedlichen Domänen befinden und der homologen oder heterologen Interaktion dienen könnten.



**Abbildung 1.5: Modellierter 3D-Struktur und schematische Darstellung des CEACAM16.** CEACAM16 ist aus vier Immunglobulin-ähnlichen Domänen aufgebaut. Die Abbildung zeigt eine 3D-Darstellung (modelliert mit dem Programm GENO3D) des CEACAM16. Gelb markiert sind die homologen Bereiche, die bei anderen CEACAMs als Interaktionsflächen mit ihren Liganden identifiziert wurden (Obrink, 1997). Daneben ist eine schematische Darstellung des Proteins mit N-Glykosylierungsstellen gezeigt (Robert Kammerer, FLI, Greifswald).



Unter den CEACAMs weisen die orthologen CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20 eine hohe Konservierung der Sequenz zwischen den unterschiedlichen Säugetierspezies auf. Die höchste Konservierung zeigt CEACAM16 mit einer weitgehenden Deckung der mRNA- und der Aminosäuresequenz bei Mensch und Maus. Die N1-Domäne zeigt eine Übereinstimmung von 86,9%, die N2-Domäne sogar von 93,8% auf Ebene der Aminosäuresequenz. Im Vergleich dazu stimmen die Aminosäuresequenzen der N1-Domäne von humanem und murinem CEACAM1 nur zu ca. 45% überein. Zwischen den verschiedenen Nagerspezies ist die Konservierung von CEACAM16 noch höher. Die N1-Domäne von Mäusen und Ratten sind zu 98,2%, die N2-Domäne zu 99,1% identisch (Zebhauser et al., 2005). Diese hohe Konservierung ist selbst für die orthologen CEACAMs außergewöhnlich und deutet auf eine essentielle Funktion von CEACAM16 hin (Abb. 1.6).

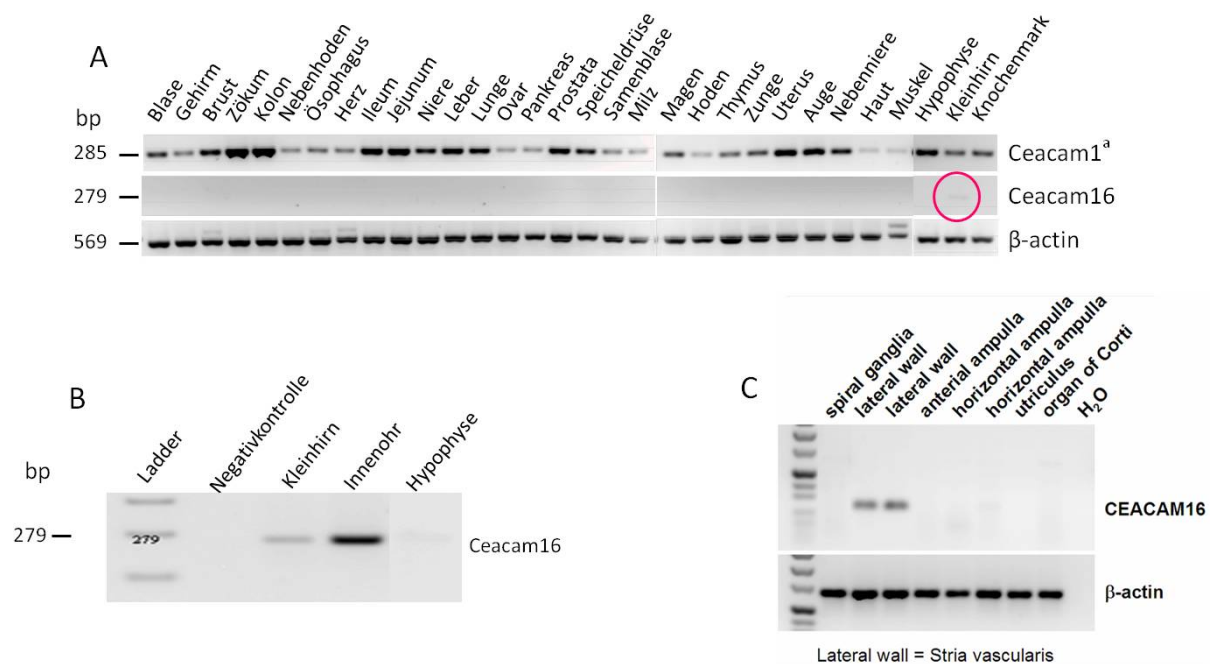


**Abbildung 1.6: Konservierung des CEACAM16-Proteins.** (A) Dendrogramm der verschiedenen CEACAM16-Domänen von den angegebenen Säugetierspezies. Es fällt auf, dass gerade die N2-Domäne und die A-Domäne sehr hoch konserviert sind, was auf die funktionelle Bedeutung dieser Bereiche hindeutet. (B) Prozentuale Sequenzübereinstimmung der CEACAM16-N1-Domäne des Menschen mit denen verschiedener Säugetiere auf mRNA- (grüne Balken) bzw. Proteinebene (dunkelblaue Balken). (Wolfgang Zimmermann, LTI, LMU München)

Erste Untersuchungen unterschiedlicher Gewebe zeigten nur eine geringe Expression im Kleinhirn (Zebhauser, 2006). Durch eine ausgedehnte Suche in EST (expressed sequence tag)-Datenbanken konnten Hinweise auf eine CEACAM16-Expression im Innenohr verschiedener Säugerspezies gewonnen werden. Diese Hinweise konnten durch den Nachweis



von CEACAM16-mRNA im humanen und murinen Innenohr, im murinen Kleinhirn und der murinen Hypophyse bestätigt werden. Für das menschliche Innenohr wird nach detaillierter Untersuchung der einzelnen Abschnitte des Innenohres auf mRNA-Ebene die *Stria vascularis* als Hauptexpressionsort von CEACAM16 angenommen (Abb. 1.7). Erste immunhistochemische Untersuchungen mittels polyklonalen Mausseren an murinen Gewebeschnitten deuten auf eine Lokalisation des Proteins auch bei Mäusen in der *Stria vascularis* und in der Tektorialmembran des murinen Innenohres hin (Krupar, 2012). Das CEACAM16-Gen ist wie die anderen Mitglieder der CEA-Familie in der Genregion 19q13 lokalisiert. Hier befindet sich ebenfalls der autosomal-dominant vererbte Taubheitslocus 4 (DFNA4). Unter Einbeziehung der bisherigen Kenntnisse über CEACAM16 ist dieser Zusammenhang von großem Interesse.

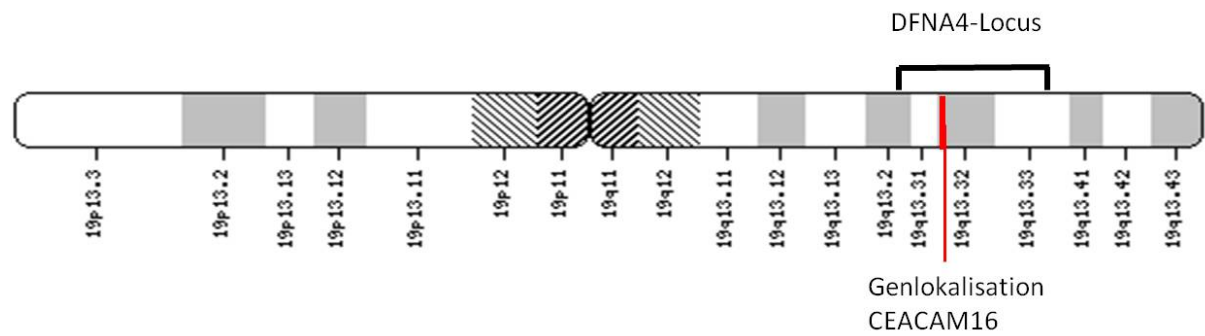


**Abbildung 1.7: Expression von CEACAM16.** (A) Limitierte Expression von CEACAM16 in Geweben adulter Mäuse (Zebhauser et al., 2005). Es zeigt sich lediglich eine schwache Bande bei Kleinhirngewebe (B) Auf Basis von EST-Datenbank-Analysen wurden Gewebe muriner Innenohren, Kleinhirne und der Hypophyse untersucht. Hier gelang jeweils der Nachweis von CEACAM16 (Krupar, 2012). (C) Bei humanen Geweben wurde die mRNA in der *Stria vascularis*, jedoch nicht in der Cochlea oder dem Spiralganglion nachgewiesen (Kammerer et al., 2012)

## 1.5 Der DFNA4-Locus

Der DFNA4-Locus wurde erstmals 1995 beschrieben (Chen et al., 1995). Dabei wurde eine milde Form der Hörstörung mit fortschreitender Hörminderung in allen Frequenzbereichen berichtet, welche zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr auftritt. Die Genregion 19q13 wurde als Ort der Mutation angenommen und es erfolgte eine erste Definition zwischen den Markern D19S414 und D19S246. Bestätigt wurden diese Ergebnisse dadurch, dass unabhängig von der ursprünglichen Definition eine zweite Familie identifiziert wurde, deren zugrunde liegende Mutation zwischen den Markern D19S412 und D19S571 lokalisiert werden konnte (Mirghomizadeh et al., 2002). Im Laufe der Zeit fand, durch Identifikation und Genanalyse einer weiteren betroffenen Familie eine Eingrenzung des Locus auf einen Bereich von 1.4 MB zwischen den Markern D19S550 und D19S867 statt (Pusch et al., 2004) (Abb. 1.8). In diesem Bereich gibt es unterschiedliche Gene, deren Defekt potenziell für eine Hörminderung verantwortlich sein könnte. Als erstes wurde das MYH14-Gen als Ort von drei unterschiedlichen Mutation bei betroffenen Familien identifiziert (Donaudy et al., 2004). MYH14 gehört zu den konventionellen Myosinen der Klasse II, einer Untergruppe der Myosinsuperfamilie und kodiert für die schwere Kette von Nicht-Muskel Myosinen der Klasse II. MYH14 zeigt ein heterogenes Expressionsmuster, welches von den ihm nahe verwandten Nicht-Muskel Myosinen abweicht und unter anderem den Dünndarm, Dickdarm und Skelettmuskel sowie die Leber und Bauchspeicheldrüse umfasst (Leal et al., 2003; Golomb et al., 2004). Im Innenohr ist MYH14 bei neugeborenen Mäusen in der *Scala media* an allen Oberflächen mit Ausnahme der Reissnermembran nachweisbar (Donaudy et al., 2004).

Im Jahr 2005 wurde die genetische Heterogenität des DFNA4-Locus nachgewiesen (Yang et al., 2005). Die amerikanische Familie, welche zur ursprünglichen Definition des Locus herangezogen wurde, zeigt ein intaktes MYH14-Gen. Aufgrund dieser Daten muss es in diesem Locus ein zweites Gen geben, bei welchem ein Defekt zu NSHL führt. Es wurden unterschiedliche Kandidatengene untersucht. Eines davon ist KCNK6, welches TWIK-2, ein Kaliumkanal der *Stria vascularis*, kodiert. Für dieses Gen konnte jedoch in den untersuchten Familien keine Mutation nachgewiesen werden (Mhatre et al., 2004). Aufgrund seiner Lokalisation innerhalb des DFNA4-Locus und seines eingeschränkten Expressionsmusters stellt CEACAM16 ein Kandidateng für den zweiten beschriebenen Defekt dar.



**Abbildung 1.8: Chromosom 19 mit DFNA4-Locus und Genlokalisierung von CEACAM16.** Der DFNA4-Locus liegt im Bereich zwischen den Markern D19S550 und D19S86 auf Chromosom19. In diesem Bereich ist auch das CEACAM16-Gen lokalisiert. Zusammen mit dem eingeschränkten Expressionsmuster und der hohen Konservierung des Proteins ist CEACAM16 daher ein Kandidatengen für NSHL mit Mutation im DFNA4-Locus.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

CEACAM16 unterscheidet sich durch mehrere Eigenschaften von den übrigen Mitgliedern der CEA-Familie. CEACAM16 ist ein sezerniertes Protein das relativ stark konserviert ist. Seine Expression wurde auf mRNA-Ebene fast ausschließlich im Innenohr nachgewiesen. Die Genlokalisierung auf Chromosom 19q13.33 macht CEACAM16 zu einem Kandidaten-gen für den DFNA4 Locus, welcher eine Rolle bei autosomal-dominant vererbter nicht-syndromischer Taubheit spielt.

Diese Arbeit hat zum Ziel, die genaue Lokalisation des CEACAM16-Proteins im Innenohr und im Kleinhirn zu bestimmen und mögliche Interaktionspartner einzugrenzen, um so Hinweise auf mögliche Funktionen von CEACAM16 zu erhalten.

Um das CEACAM16-Protein zu detektieren soll ein neuer, mit der Firma Aldevron (Freiburg) entwickelter Antikörper gegen das humane CEACAM16, hinsichtlich seiner Spezifität, seiner Verwendbarkeit in der Immunhistochemie und seines Bindungsepitopes charakterisiert werden. Die Lokalisation des CEACAM16-Proteins soll mit Hilfe immunhistochemischer Methoden, an *C57BL/6*-Mäusen untersucht werden. Als Negativkontrolle sollen CEACAM16-Knock-out-Mäusen dienen, die in unserem Labor entwickelt werden.

Mitglieder der CEA-Familie zeichnen sich durch ausgeprägte homo- und heterophile Adhäsionsfunktionen aus. Um mögliche Interaktionspartner von CEACAM16 einzugrenzen, soll die Expression von CEA-Familienmitgliedern im Innenohr bestimmt und die homo- und heterophile Adhäsionsfunktion von CEACAM16 überprüft werden.

# 3 Material

## 3.1 Verbrauchsmaterialien

CryoTube™ Vials  
Einmalhandschuhe

Objektträger:  
Superfrost & Superfrost Plus

PCR Tubes

Pipettenspitzen

Reagenzröhrchen (15/50 ml)  
Reaktionsgefäße (1, 5/2ml)  
Skalpelle (Nr.10 / Nr.20)  
Sterile Pipetten (2/5/10/25/50 ml)

Sterile Filter-Spitzen (10/20/200/1000  
 $\mu$ l)  
Zellkulturplatten (6-well, 96-well)  
Zellkulturflaschen (10cm<sup>2</sup>, 25cm<sup>2</sup>,  
75cm<sup>2</sup>)

Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark  
Semperit Technische Produkte GmbH  
& Co. KG, Wien, Österreich

Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH  
& Co. KG, Braunschweig, Deutschland  
Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf,  
Deutschland  
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
Gilson, Middleton, USA  
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
Falcon, Heidelberg, Deutschland  
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark  
Falcon, Heidelberg, Deutschland  
Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark

Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland  
BD Bioscience, Heidelberg, Deutsch-  
land

## 3.2 Enzyme und Kits

Antarctic Phosphatase

DNA-Gelextraktion  
Restriktionsendonukleasen  
FastDigest® Enzyme (XhoI, XbaI,  
HindIII)  
Konventionelle Enzyme (HindIII,  
NheI)  
Rapid DNA Ligation Kit  
Plasmid - Präparation:  
NucleoBond Xtra Maxi Plus  
QIAprep Spin Miniprep Kit

New England Biolabs, Schwalbach,  
Deutschland  
Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland  
Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland  
Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland  
Macherey-Nagel, Düren, Deutschland  
Qiagen, Hilden, Deutschland

Reverse Transkription RNA 6000 Pico Kit	Promega, Mannheim, Deutschland Agilent Technologies, Santa Clara, USA
RNeasy Mini/Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland

### 3.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose, Electrophoresis Grade	Invitrogen Life Technologies, Karl- lsruhe, Deutschland
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Aquatex®	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
BSA (Albumine bovine fraction V)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylbutan	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Größenmarker	
GeneRuler®1kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler®100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
DPX Eindeckmittel	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
EDTA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
EDTA+20%Zitronensäure	Apotheke, LMU, München- Großhadern, Deutschland
Ethanol (100%, 95%, 75%)	Apotheke, LMU, München- Großhadern, Deutschland
Ethidiumbromid	Bio-Rad, München, Deutschland
Ethylaminocarbazol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
4% Formaldehyd	Apotheke, LMU, München- Großhadern, Deutschland
FuGene HD	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Glycerin	VWR International GmbH, Darm- stadt, Deutschland
HEPES	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
Hank's Balanced Salt Solution	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
Isofloran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

6x DNA Loading Dye  
 (DNA-Auftragspuffer)  
 Mayers Hämalaunlösung  
 Methanol  
 MEM NEAA  
 O.C.T.TM Einbettmedium  
  
 PBS-Puffer  
  
 Penicillin/Streptomycin/Glutamin-  
 Lösung  
 RNAlater  
 Roti-Histol®(Xylolersatz)  
 RPMI 1640, Medium  
 Sodium pyruvate  
 Streptavidin-Alkalische-Phosphatase  
 Streptavidin-Peroxidase  
 Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer, 10x  
 Target Retrieval Solution  
 Tris-HCl  
 Tryptanblau-Lösung  
 5 % Trypsin-EDTA Lösung (10x)  
 Wasserstoffperoxid 30%  
 Zeocin

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot,  
 Deutschland  
 Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Merck, Darmstadt, Deutschland  
 GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Tissue-Tek®Sakura Finetek GmbH,  
 Staufen, Deutschland  
 Apotheke, LMU, München-  
 Großhadern, Deutschland  
 GIBCO BRL, Karlsruhe , Deutschland  
  
 Applied Biosystems, Foster City, USA  
 Roth, Karlsruhe, Deutschland  
 GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland  
 GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Sigma, Taufkirchen. Deutschland  
 Sigma, Taufkirchen, Deutschland  
 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 DakoCytomation, Glostrup, Dänemark  
 GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Sigma, Taufkirchen, Deutschland  
 GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 3.4 Geräte

Agilent Bioanalyzer 2100,  
  
 RNA 6000 Pico Chip  
 Färbeautomat:  
     Combitec Slide Stainer 4009  
  
 Entwässerungsautomat:  
     Shandon Hypercenter XP  
 Fluoreszenzbildsystem:  
     Fluor-S MultiImager™  
 FLUOstar Optima  
 Gelelektrophoresekammer horizontal  
 Inkubationsschrank  
  
 Kryostat Leica CM3050 S  
  
 Magnetrührer RCT Basic

Agilent Technologies, Santa Clara,  
 USA  
  
 Histolab Products, Göteborg,  
 Schweden  
  
 Thermo, Langenselbold, Deutschland  
 Bio-Rad, München, Deutschland  
  
 BMG Labtech, Offenburg, Deutschland  
 GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Heraeus Instrumente GmbH, Hanau,  
 Deutschland  
 Leica Microsystems GmbH,  
 Mannheim, Deutschland  
 IKA Labortechnik, Staufen,  
 Deutschland

Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Leica DMIL, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Deutschland
Mikrowelle Micromat	AEG, Nürnberg, Deutschland
Paraffinausgiesstation: EG1160	Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Deutschland
Photokamera	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Pipettierassistent Pipetpoy accu	Hirschmann, Neckartenzlingen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotationsmikrotom Biocut 2035	Gilson, Middleton, USA
Schüttler CERTOMATâH	Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Deutschland
Sterilbank HERA safe HS12	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Stickstofftank Chronos Biosafe	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau, Deutschland
Thermocycler Peltier Thermal Cyclor PTC200	Messer Griesheim, Sulzbach, Deutschland
Thermomixer Comfort (Heizblock)	MJ Research Inc., Watertown, USA
Ultra-Turrax	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex VF2	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Waagen:	
Präzisionswaage BP2100	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Analysewaage MC1	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad Julabo 19	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen DNA Speed Vac DNA110	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
MIKRO 20	Savant Instruments, New York
Megafuge 2.0	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Shandon Zytozentrifuge	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau, Deutschland
Varifuge 3.0R	Thermo, Langenselbold, Deutschland
	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau, Deutschland



### 3.5 Immunhistologie

#### *Polyklonales Serum*

Maus Anti-CEACAM16-Serum

Rosemarie Krupar, LTI, LMU,  
München, Deutschland

Maus Anti-CEACAM16-  
Präimmunserum

Rosemarie Krupar, LTI, LMU,  
München, Deutschland

Maus Anti-CEACAM20-Serum

Andreas Eisenried, LTI, LMU,  
München, Deutschland

#### *Nicht-konjugierte Antikörper*

9D5 Maus Anti-hCEACAM16

Aldevron, Freiburg, Deutschland

Anti MOPC Antikörper

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Anti myc-tag Antikörper

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

#### *Konjugierte Antikörper*

9D5 Maus Anti-hCEACAM16  
biotinyliert

Aldevron, Freiburg, Deutschland

#### *Kits für die Immunhistologie*

ImmPRESS<sup>TM</sup>

Vector Laboratories, Burlingame, USA

Biotin/Streptavidin Blocking Kit

Vector Laboratories, Burlingame, USA

Mouse-to-Mouse IHC Detection

Millipore Corporation, Billerica, USA

System Kit, Red color precipitate,

### 3.6 Oligonukleotide

#### **Bezeichnung**

#### **Sequenz**

CEACAM1-like 4N-f

5' TCCTGGTGGCCAGTTACATT 3'

CEACAM1-like 4A-r

5' GCTGCTACAGACGAGACGAA 3'

CEACAM2 L-f

5' GCTATGAAAAGCAGGGCAGA 3'

CEACAM2 N-r

5' TGAAATTGTCCAGTCAGGACC 3'

N dom s

5' CTTAACCTGCTGGAATGCACCCGCCG 3'

CEACAM9 A-r

5' CAGCTTCTGTTACCGCGGTGCTGTCT 3'

CEACAM10 N1-f

5' GCTAGATCAAACTTTGAAATTACTCC 3'

CEACAM10 N2-r

5' ACAGGCATTAGGGTATGATCG 3'

CEACAM12 N1-f

5' AAGGAGGTAAACTGCTCAAGAT 3'

CEACAM12 N2-r

5' AGTTGAGAAGTAGGATGCTTTC 3'

CEACAM13 N1-f

5' GGAGCTGCACCGTTCAAGT 3'

CEACAM13 N2-r

5' TGCGTCTTTCTTCTTGACATTG 3'

CEACAM14 N1-f

5' CCTGGTTTACAGGAGCTAGAGT 3'

CEACAM14 N2-r

5' GGCATCTGAAAGACCCACAA 3'

CEACAM16 N1-f

5' TCCTGGTGGCCAGTTACATT 3'

CEACAM16 A-r

5' GCTGCTACAGACGAGACGAA 3'

CEACAM17 N-f	5' AAACGGCCGATAGACAACGA 3'
CEACAM17 A1-r	5' GAACGGGTCACTATGGAAGG 3'
CEACAM18 N-f	5' TGAAGTGGACACTAGCAACG 3'
CEACAM18 B-r	5' TGCTTAGGAAGGAGCCGTTA 3'
CEACAM15 N-f	5' CACATCGAGATGATCCCAGA 3'
CEACAM15 TM-r	5' TCCCAATGATGATGGCTACC 3'
CEACAM20 B2-f	5' GATCTGCCTCTGTCCTGGTC 3'
CEACAM20 Cyt5-r	5' TGGGGTGATCTTGCAGTAAA 3'
mC16-AP for	5' ACTGGCTAGCCTCGAACATCAGCCTTGG 3'
mC16-AP rev	5' ACTGAAGCTTCCACCTGTAGCTCCACCTC 3'
mC16N1A-AP for	5' ACTGGCTAGCTTGGATGAAAATGCCATTGA 3'
mC16N1A-AP rev	5' ACTGAAGCTTTGCCGAAGTATACCGTCAAGTTC 3'
AP-BN2-mC16 for	5' ACTGCTCGAGGTATACTTCGGCCCTGAACGA 3'
AP-BN2-mC16 rev	5' ACTGTCTAGAGCCACCTGTAGCTCCACCTC 3'
hC16-AP for	5' ACTGGCTAGCACTCGGTTTGGGGTGAAAG 3'
hC16N1A-AP for	5' ACTGGCTAGCACTCGGTTTGGGGTGAAAG 3'
hC16-AP rev	5' ACTGAAGCTTGCAGCTCCACTTCCAGTGTC 3'
hC16N1A-AP rev	5' ACTGAAGCTTTGCCAAAGTACACGGTCAGGT 3'
mC16A rev	5' TGCCGAAGTATACCGTCAAGTTC 3'
R-AP Primer	5' GCCTCGCGGTTCAGAAAG 3'
Mouse $\beta$ -aktin for	5' ATGGATGACGATATCGCT 3'
Mouse $\beta$ -aktin rev	5' ATGAGGTAGTCTGTCAGGT 3'

### 3.7 Bakterien

XL1-Blue Competent Cells

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

### 3.8 Zelllinien

HEK293T	Humane embryonale Nieren- zelllinie semi-adhärentes Wachstum	Institut für Physiologie, AG Fr. Prof. Dr. Walzog, LMU, München, Deutschland
---------	--------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

### 3.9 Gewebe

Großhirn, murin	LTI, LMU, München, Deutschland
Innenohr, human	Institut für Neurologische Forschung, LMU, München, Deutschland
Innenohr, murin	LTI, LMU, München, Deutschland
Kleinhirn, murin	LTI, LMU, München, Deutschland

### 3.10 Tierstämme

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Mäuse der Stämme CEA2682xC57/B6N, Lgr5-EGFP, T-tg424xC57/B6, CR-C57/B6 sowie Ceacam16/C3 für die Isolation von Organen verwendet. Die entnommenen Gewebe dienten zur Herstellung von paraffin- und kryofixierten Histologiepräparaten und zur Extraktion von mRNA.

### 3.11 RNA

Gehirn, gepoolt murin	LTI, LMU, München, Deutschland
Großhirn, murin	LTI, LMU, München, Deutschland
Hypophyse, murin	Rosemarie, Krupar, LTI, LMU, Deutschland
Innenohr, murin	LTI, LMU, München, Deutschland
Jejunum, murin	Wolfgang Zimmermann, LTI, LMU München, Deutschland
Kleinhirn, murin	LTI, LMU, München, Deutschland
Testis, murin	Wolfgang Zimmermann, LTI, LMU München, Deutschland

### 3.12 Verwendete Vektoren

pAPtag-5	GenHunter, Nashville, USA
pB1-hCEACAM16	Aldevron Freiburg (vormals Genovac GmbH), Freiburg, Deutschland
pRC-CMV Ceacam1-4L	Wolfgang Zimmermann, LTI, LMU München, Deutschland
pSC-hCeacam16	Rosemarie Krupar, LTI, LMU München, Deutschland
pSport6-mCeacam16	Rosemarie Krupar, LTI, LMU München, Deutschland
pVV1-mCeacam16	Rosemarie Krupar, LTI, LMU München, Deutschland

### 3.13 Software und Internetadressen

2100 Expert	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
CEA Homepage	<a href="http://www.carcinoembryonic-antigen.de/">http://www.carcinoembryonic-antigen.de/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
ExPASy Bioinformatics Resource Portal	<a href="http://web.expasy.org/translate/">http://web.expasy.org/translate/</a>
Hereditary Hearing Loss Homepage	<a href="http://hereditaryhearingloss.org/">http://hereditaryhearingloss.org/</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Primer3	Steve Lincoln, Mark Daly und Eric S. Lander
Vektor NTI <sup>TM</sup>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

# 4 Methoden

## 4.1 Molekulargenetische Methoden

### 4.1.1 Klonierung von Plasmiden

#### DNA-Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient in diesem Fall der Amplifikation von Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Fragmenten aus Plasmid-DNA mit gleichzeitigem Einfügen von Restriktionsschnittstellen an den 5' und 3' Enden der amplifizierten DNA-Stücke.

Die Oligonukleotide (Primer) werden mit Hilfe des Programms "Primer 3" (Rozen und Skaletsky, 2000), entworfen und bestehen aus 18 bis 33 Nukleotiden. Um die Restriktionsschnittstellen einzufügen, werden diese den zur Ziel-DNA komplementären Anteilen der Primer angefügt. Als DNA-Polymerase dient die Taq-DNA-Polymerase sowie die High-Fidelity-DNA-Polymerase, welche zur Fehlerkorrektur (proof reading) fähig ist. Für diese Fehlerkorrektur ist eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Polymerase verantwortlich. Die unterschiedlichen Primerkombinationen erfordern aufgrund der unterschiedlichen Nukleotidzusammensetzung und Länge unterschiedliche Anlagerungs- oder Annealing-Temperaturen. Durch die unterschiedliche Größe der zu amplifizierenden Bereiche ergeben sich unterschiedliche Polymerisationszeiten. Von der Firma Fermentas wird eine Polymerisationszeit von einer Minute je eintausend Basen für die High-Fidelity-DNA-Polymerase und die doppelte Polymerisationsgeschwindigkeit für die Taq-DNA-Polymerase angegeben. Die Reaktionsbedingungen werden dementsprechend für jede durchgeführte PCR angepasst. Die Konzentrationen des 10x Puffers, der High-Fidelity-Polymerase, des Templates und der Primer werden entsprechend denen im Protokoll der Firma Fermentas empfohlenen Bedingungen gewählt, wobei das Volumen 25  $\mu$ l pro Reaktionsansatz beträgt. Die Endkonzentrationen sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 dargestellt. Die einzelnen Reagenzien werden zusammenpipettiert, wobei auf eine ständige Kühlung auf Eis geachtet wird. Die vorübergehende Lagerung des PCR-Produktes in der Reaktionslösung bis zu dessen weiterer Bearbeitung erfolgt bei +4 °C, die längerfristige Aufbewahrung bei -20 °C.

Tabelle 4.1: Standartansatz einer PCR mit der Taq-DNA-Polymerase

Komponenten	Endkonzentration	Volumen pro Reaktion ( $\mu\text{l}$ )
DNA-Template (0,02-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		1-2
Primer Forward (10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{M}$	1
Primer Reverse (10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{M}$	1
PCR Puffer 10x mit $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	1x	2,5
$\text{MgCl}_2$ 25 mM	2,0 mM	2
dNTP je 2 mM		2,5
Taq-DNA-Polymerase 5,0 $\text{U}/\mu\text{l}$	1 $\text{U}/\mu\text{l}$	0,2
Aqua dest.		ad 25 $\mu\text{l}$

Tabelle 4.2: Standartansatz einer PCR mit der High-Fidelity-Polymerase

Komponenten	Endkonzentration	Volumen pro Reaktion ( $\mu\text{l}$ )
DNA-Template (0,02-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		1-2
Primer Forward (10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{M}$	1
Primer Reverse (10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{M}$	1
PCR Puffer 10x inkl. $\text{MgCl}_2$	1x	2,5
dNTP je 2 mM		2,5
High-Fidelity-Polymerase 5,0 $\text{U}/\mu\text{l}$	0.65 $\text{U}/\mu\text{l}$	0,13
Aqua dest.		ad 25 $\mu\text{l}$

Tabelle 4.3: Reaktionsbedingungen der PCR

Schritt	Temperatur $^{\circ}\text{C}$	Dauer ( $\text{min} : \text{sec}$ )
Anfangs-Denaturierung	95	02 : 00
Amplifikation (30 – 35 Wiederholungen)		
Denaturierung	94	00 : 30
Annealing	59-61	01 : 10
Polymerisation	72	02 : 00
Polymerisation	72	10 : 00

Als Positivkontrolle dienen Primerpaare, die schon bei vorangegangenen Experimenten erfolgreich eingesetzt wurden. Die Negativkontrolle bildet ein Reaktionsansatz, in dem statt dem Template die gleiche Menge "PCR grade"  $\text{H}_2\text{O}$  verwendet wird.

### Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung der in der PCR entstandenen DNA-Fragmente durchgeführt. DNA wandert innerhalb eines elektrischen Feldes aufgrund

der negativen Ladung der enthaltenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe der DNA-Fragmente, der angelegten Spannung und dem Agaroseanteil im Gel ab. Je nach zu erwartender Fragmentgröße werden Gele aus Trisaminomethan(Tris)-Acetat-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Puffer kurz TAE-Puffer mit 1-2 % Agarose verwendet (Zusammensetzung siehe Tab. 4.4). Je höher die Anzahl an Basenpaaren, desto niedriger sollte die Agarosekonzentration gewählt werden. Ethidiumbromid dient zum Sichtbarmachen der DNA-Fragmente im UV-Licht. Die Elektrophoresekammer wird so weit mit einem Laufpuffer aus 200 ml 10x TAE-Puffer (0,4 M Tris, 0,01 M EDTA-Natrium-Salz), 1800 ml Aqua dest. und 40  $\mu$ l Ethidiumbromid gefüllt, dass die Oberfläche des Gels bedeckt ist. Vor dem Einpipettieren der Proben in die Geltaschen werden diese mit einem 6x Auftragspuffer, welcher 60 % Glycerol, 0,03 % Bromphenol-Blau und 0,03 % Xylene-Cyanol in 10 mM TrisHCL mit 60 mM EDTA enthält, versetzt. Bromphenol-Blau und Xylene-Cyanol dienen dazu, die Wanderung der Proben im Gel visuell verfolgen zu können. Das im Puffer enthaltene Glycerol erhöht die Dichte der DNA-Lösung, wodurch diese im Puffer sinken und sich am Boden der im Gel enthaltene Taschen ansammeln. Die Auftrennung der DNA erfolgt durch 90-minütige Elektrophorese bei 90 Volt.

**Tabelle 4.4: Zusammensetzung eines 1%-igen Agarosegels**

Komponente	Menge
10x TAE-Puffer	10 ml
Aqua dest.	90 ml
Ethidiumbromid	2 $\mu$ l
Agarosepulver (Elektrophoresegrad)	1 g

### Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Banden mit dem gewünschten PCR-Produkt, werden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur Extraktion bei 4 °C (maximal 24 h) aufbewahrt. Zur Aufreinigung der DNA aus den präparativen Agarosegelen dient das Perfectprep Gel Cleanup Kit, welches dem Protokoll der Firma entsprechend durchgeführt wird. Diese Aufreinigung beruht auf einem von Chen et al. beschriebenen Prinzip der Bindung der DNA an eine Glasfasermembran (Chen und Thomas, 1980). Die Gelstücke werden nach Zugabe eines salzhaltigen Puffers bei 50 °C gelöst. Nach

Addition von Isopropanol wird die Lösung auf eine Minisäule mit einer Glasfasermembran gegeben und zentrifugiert. Hierbei erfolgt die selektive Bindung der DNA an die Membran. Durch mehrere Waschschrte mit einem Waschpuffer werden Primer, Salze und Enzyme entfernt. Die Elution der DNA kann mit einem mitgelieferten Elutionspuffer oder hochreinem Aqua dest. erfolgen. Es können bis zu 10  $\mu\text{g}$  DNA je Säule aufgereinigt werden.

### Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration im Eluat wird eine Absorptionsmessung bei 260 nm in einer Quarzküvette durchgeführt. Eine  $\text{OD}_{260}$  von 1 entspricht dabei bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Zur Beurteilung der Kontamination der DNA durch Proteine wird das Verhältnis der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm (260/280 Ratio) bestimmt. Bei einer reinen DNA-Lösung liegt dieses im Bereich von größer 1,8. Bei größerer Verunreinigung durch Proteine sinkt das Verhältnis, da Proteine ihre maximale Absorption bei 280 nm zeigen.

### Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Die PCR-Produkte und die Zielvektoren werden jeweils mit den beiden gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut. Hierbei werden zum einen NheI und HindIII als konventionelle Enzyme sowie zum anderen HindIII, XbaI und XhoI als FastDigest®-Enzyme verwendet. Die verschiedenen Restriktionsansätze sind in den nachstehenden Tabellen aufgeführt. Eine detaillierte Erklärung zu den verwendeten Vektoren und Fragmenten findet sich in Abschnitt 5.2.1.

**Tabelle 4.5: Restriktionsansatz für den Vektor pAPtag-5 der Firma GeneHunter sowie die Fragmente mC16, mC16N1A, hC16 und hC16N1A**

Komponente	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
DNA	entsprechend 1 $\mu\text{g}$
10x Puffer (Tango buffer)	2
HindIII 10 $\text{U}/\mu\text{l}$	2
NheI 10 $\text{U}/\mu\text{l}$	2
Aqua dest.	ad 20 $\mu\text{l}$

**Tabelle 4.6: Restriktionsansatz für den Vektor pAPtag-5 und das Fragment mC16BN2**

Komponente	Volumen ( $\mu l$ )
DNA	entsprechend 1 $\mu g$
10x Puffer (FastDigest®-Buffer)	2
XbaI 1 $FDU/\mu l$	2
XhoI 1 $FDU/\mu l$	2
Aqua dest.	ad 20 $\mu l$

**Tabelle 4.7: Restriktionsansatz für die Vektoren pSC-A-hC16 und pRc/CMV-Ceacam1-4L**

Komponente	Volumen ( $\mu l$ )
DNA	entsprechend 1 $\mu g$
10x Puffer (FastDigest®-Buffer)	2
XbaI 1 $FDU/\mu l$	2
HindIII 1 $FDU/\mu l$	2
Aqua dest.	ad 20 $\mu l$

Die Inkubationszeiten für den Restriktionsverdau wird für die jeweiligen Enzymkombinationen, wie vom Hersteller empfohlen, angepasst. Sie betragen für die konventionellen Enzyme eine Stunde bei 37 °C, für die FastDigest®-Enzyme fünf Minuten bei 37 °C. Danach erfolgt die thermische Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen bei 65 °C bzw. 80 °C je nach Angaben des Herstellers.

Um überschüssige DNA-Fragmente zu entfernen, wird eine Aufreinigung durch eine erneute Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gelaufreinigung durchgeführt.

### Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation des mit Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektors ohne Aufnahme eines DNA-Fragmentes zu verhindern, wird der Vektor mit der Antarctic-Phosphatase dephosphoryliert. Hierzu wird ein Reaktionsansatz aus DNA-Lösung mit einer DNA-Menge von 2  $\mu g$ , 2  $\mu l$  Antarctic-Phosphatase und dem 10-fach Antarctic-Phosphatase-Reaktionspuffer hergestellt. Die Inkubation erfolgt für 60 Minuten bei 37 °C mit anschließender thermischer Inaktivierung der Phosphatase bei 65 °C für fünf Minuten.

### DNA-Ligation

Zur Ligation der DNA nach Restriktionsverdau wird das Rapid-DNA-Ligation-Kit verwendet, das auf der T4-DNA-Ligase basiert, welche die Bildung von Phosphodiester-



bindungen zwischen 5' und 3' Enden von doppelsträngiger DNA katalysiert. Das molare Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA beträgt zwischen 2 : 1 und 2,5 : 1. Die Berechnung der eingesetzten DNA-Mengen erfolgt dabei durch die folgende Formel:

$$\text{ng Vektor} \times \frac{\text{kb Insert}}{\text{kb Vektor}} \times \text{molares Verhältnis Vektor:Insert} = \text{ng Insert}$$

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen in den Ausgangslösungen erfolgt durch Abschätzung nach Agarose-Gelelektrophorese anhand des GeneRuler®-DNA-Ladder. Die Gelelektrophorese wird mit einer kleinen Probe der aufgereinigten Produkte aus dem Restriktionsendonukleaseverdau durchgeführt. Im Anschluss wird das Agarosegel mit dem Fluor-S MultiImager aufgenommen. Anhand der digitalen Bilder werden die Intensität der Banden des Inserts und des Vektors im Gel mit den Banden der Leiter mit bekannter DNA-Konzentration verglichen und so die DNA-Konzentration der Ausgangslösung abgeschätzt. Der Ligationsansatz (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.8) wird fünf Minuten bei Raumtemperatur (22 °C) inkubiert und die Ligase nachfolgend für zehn Minuten bei 65 °C inaktiviert. Als Negativkontrolle dient ein Ligationsansatz in welchem anstatt des Inserts eine äquivalente Menge Wasser hinzugegeben wird.

**Tabelle 4.8: Beispiel eines Ligationsansatzes**

Komponente	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Insert (13,3ng/ $\mu\text{l}$ )	1,8
Vektor (57ng/ $\mu\text{l}$ )	2
T4-DNA-Ligase (5U/ $\mu\text{l}$ )	1
Rapid-Ligation-Buffer 5x	4
Aqua dest.	11,5
Gesamt	20 $\mu\text{l}$

### Transformation kompetenter Bakterien

Im Rahmen der Transformation kompetenter Bakterien werden die Plasmide durch Porenbildung in die Bakterien eingebracht. Bei der Bakterienvermehrung kommt es zu einer Vervielfältigung der Plasmide mit einer äußerst geringen Fehlerrate. Für dieser Arbeit wird der kompetente Bakterienstamm XL1-Blue verwendet. Es erfolgt jeweils eine Transformation von 25  $\mu\text{l}$  des Bakterienstamms mit dem inaktivierten Ligationsansatz. Der Ausgangsvektor, ohne Insert, wird als Positivkontrolle und die Negativkontrolle der Liga-

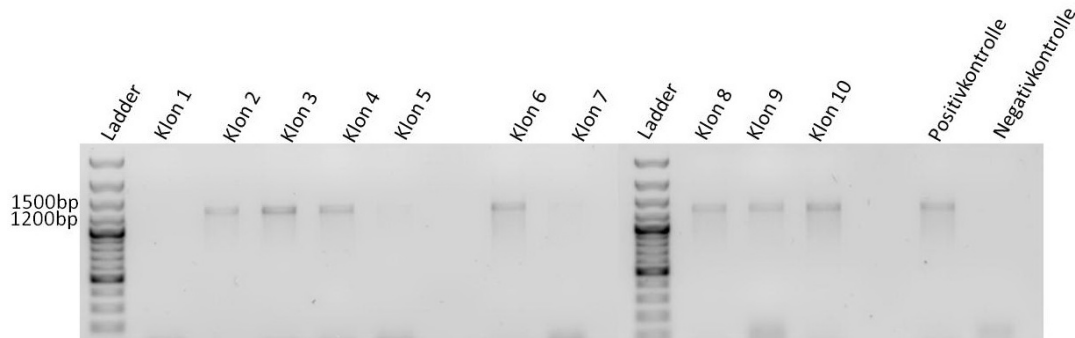
tion als Negativkontrolle der Transformation verwendet.

Es werden 100 *ng* Vektor-DNA bzw. 2,5  $\mu$ l der Ligationsansätze zu den Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden die Bakterien für 45 Sekunden auf 42 °C erwärmt (Hitzeschock), worauf wieder eine zweiminütige Inkubation auf Eis folgt. Durch diese Behandlung entstehen kleine Poren in der Membran, durch welche die DNA in die Bakterien hineingelangen kann. Danach werden zu jedem Transformationsansatz 125  $\mu$ l vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und die Bakterienkulturen eine Stunde bei 37 °C und 300rpm inkubiert, wobei der Gasaustausch mit der Umwelt gewährleistet wurde. Am Ende der Inkubationszeit werden von jedem Ansatz 30  $\mu$ l auf Agarplatten mit Ampicillin (LB-Medium mit 1,5 % Select-Agar und 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Wahl des Antibiotikums zur Selektion muss dabei dem transformierten Vektor angepasst und dem jeweils vorhandenen Resistenzgen entsprechen. Nur nach erfolgreicher Ligation kann das Resistenzgen korrekt abgelesen werden und somit eine Kolonie entstehen.

### Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der nach Transformation gewachsenen Bakterienkolonien auf die Präsenz des Inserts wird eine Kolonie-PCR durchgeführt. Anstelle eines reinen DNA-Templates wird eine kleine Menge Koloniematerial, welches mit einer sterilen Pipettenspitze von der Kulturplatte abgenommen wurde, zum Ansatz gegeben. Die Primer sind dabei identisch mit denen, welche zuvor zur Amplifikation des Inserts genutzt wurden. Die PCR erfolgt mit den in Tabelle 4.3 dargestellten Reaktionsbedingungen, wobei nur 30 Reaktionszyklen durchgeführt werden. Zur Analyse des PCR-Produktes dient eine Agarose-Gelelektrophorese. Bei korrekt inseriertem Zielfragment findet man ein PCR-Produkt mit der vorbekannten Größe des Inserts. Beispielhaft ist dies in Abbildung 4.1 gezeigt.

**Abbildung 4.1: Agarose-Gelelektrophorese der Produkte einer Kolonie-PCR nach Transformation kompetenter XL1-Blue-Bakterien mit dem Vektor pAPtag-5-hC16.** Nach Transformation wurden 10 Klone mit Hilfe einer Kolonie-PCR auf die Präsenz des Inserts untersucht. Hierzu dienten die gleichen Primer wie bei der PCR zur Amplifikation aus Plasmid-DNA. Das zu erwartende PCR-Produkt hat eine Größe von 1297 bp und entspricht der humanen CEACAM16-cDNA mit artifiziell angefügten Restriktionsschnittstellen für NheI und HindIII. Als Positivkontrolle diente die Plasmid-DNA aus welcher das Insert amplifiziert wurde, als Negativkontrolle hochreines Aqua dest.



### Anlegen einer Bakterien-Dauerkultur

Zum dauerhaften Erhalt der transformierten XL1-Blue-Bakterien werden Glycerol-Dauerkulturen angelegt. Hierzu werden eine Bakterienkolonie von der Agarplatte geerntet und über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin oder einem anderen Antibiotikum entsprechend des Resistenzgens des Plasmides kultiviert. In einem Kryoröhrchen werden 470  $\mu\text{l}$  dieser Kultur mit 100  $\mu\text{l}$  87 % Glycerol versetzt und dann bei -80 °C aufbewahrt.

### Plasmidpräparation

Zunächst wird eine 2 ml Bakterienkultur angelegt, indem eine Bakterienkolonie von der Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben wird. Diese Kultur wird bei 37 °C für 12 bis 16 Stunden inkubiert. Die Isolierung des Plasmids aus der Bakterienkultur erfolgt mittels des Qiaprep Spin Miniprep Kits. Bei diesem Verfahren wird die Plasmid-DNA nach Lyse der Bakterienzellen und Abzentrifugieren grober Verunreinigungen an eine Silicamembran in einer Zentrifugationssäule gebunden. Durch Waschschrte werden Verunreinigungen entfernt und die Plasmid-DNA am Ende der Präparation mit 50  $\mu\text{l}$  sterilem Aqua dest. eluiert.

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen zu erhalten werden 2 ml Bakterienkulturen nach acht Stunden Inkubation in 250 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und weitere 12 bis 16 Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wird die Plasmidpräparation mit dem NucleoBond Xtra Maxi Plus Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## Überprüfung der Plasmide

Die Überprüfung der bei den Klonierungen entstandenen Plasmide erfolgt durch Kontrollverdau und Sequenzierung. Beim Kontrollverdau wird das Insert mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid geschnitten und dessen Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Sequenzierungen wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Martinsried, München, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wird die Plasmid-DNA in einem Volumen von 15  $\mu$ l mit einer Konzentration von 50-100 ng/ $\mu$ l und entsprechende Primer in einer Konzentration von 2 pmol/ $\mu$ l und ebenfalls einem Volumen von 15  $\mu$ l an die Firma MWG gesendet.

### 4.1.2 Expressionsanalysen

#### RNA-Isolierung

Die RNA wird aus murinen Innenohren, Kleinhirnen und Großhirnen gewonnen. Nach der Entnahme werden die Gewebe in RNAlater (10  $\mu$ l pro mg Gewebe) über Nacht bei 4 °C fixiert. Zur Zerkleinerung der Gewebe dient ein Ultra-Turrax. Bei der Zerkleinerung der Innenohren (3 x 30 sec) bildet sich ein weißes Knochenmehl, welches sich am Boden des Gefäßes absetzt. Sowohl Großhirn als auch Kleinhirn lassen sich deutlich besser mit dieser Methode homogenisieren (2 x 20 sec), wobei die Bildung von Schaum auf dem Homogenisat durch kurze Intervalle der Homogenisierung vermieden wird. Zur Isolation der RNA dient das RNeasy®-Kit. Die Isolation wird nach Protokoll des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien durchgeführt. Dieses Kit beruht auf der Denaturierung der im Lysat enthaltenen Proteine inklusive der RNase mit Guanidinisothiocyanathaltigem Puffer und der Bindung der RNA an eine Silicamembran in Anwesenheit von Ethanol.

Zur Bestimmung der Konzentration der RNA im Eluat wird eine Absorptionsmessung analog zur Konzentrationsbestimmung von DNA-haltigen Eluaten durchgeführt.

#### Überprüfung der Qualität der isolierten RNA

Die Qualität der RNA wird mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer 2100 unter Verwendung des RNA 6000 Pico Kits bestimmt. Hierbei wird eine Kapillarelektrophorese in Verbindung mit einer fluoreszenzbasierten Quantifizierung angewendet. Die Auswertung erfolgt mit

der Software 2100 Expert. Zum einen wird bei dieser Methode die Konzentration der RNA bestimmt, zum anderen wird ihre Qualität bzw. Degradierungsgrad in Form der RNA integrity Number (RIN) ausgedrückt.

### Reverse Transkription

Zur Umwandlung der RNA in cDNA wird das Reverse Transkription System (Promega GmbH, Madison, USA) verwendet. Hierbei wird unter Verwendung der AMV Reverse Transkriptase eine zur RNA komplementäre cDNA mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Es wird 1  $\mu\text{g}$  der RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 9  $\mu\text{l}$  verdünnt und zur Denaturierung für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Anschließend wird der in Tabelle 4.9 dargestellte Reaktionsansatz hergestellt und die in Tabelle 4.10 aufgeführten Versuchsschritte durchgeführt.

**Tabelle 4.9: Reaktionsansatz der reversen Transkription**

Komponenten	Endkonzentration	Volumen pro Reaktion ( $\mu\text{l}$ )
RNA Template in RNase freiem $\text{H}_2\text{O}$	1 $\mu\text{g}$ in 9 $\mu\text{l}$	
AMV Reverse Transkriptase 25U/ $\mu\text{l}$	15U/ $\mu\text{gRNA}$	0,6
10x Reverse Transkription Buffer	1x	2
Random Primer 10pmol/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$ x	1
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 mM	4
dNTP Mix 10 mM	1mM	2
Rekombinanten RNasin Ribonuclease Inhibitor 1 U/ $\mu\text{l}$		0,5
RNase freies Aqua dest.		ad 20 $\mu\text{l}$

**Tabelle 4.10: Reaktionsbedingungen der reversen Transkription**

Schritt	Temperatur °C	Inkubationszeit (min)
Anlagerung	25	10
Elongation	42	60
Inaktivierung	95	5

### Nachweis einer Genexpression durch PCR

Zum Nachweis einer Expression eines Gens in einem bestimmten Gewebe wird versucht dessen cDNA in der gesamten cDNA eines Gewebes nachzuweisen. Wird dabei ein Gen

genutzt, welches mit großer Sicherheit in diesem Gewebe nachweisbar ist (housekeeping-Gen, z.B. beta-Aktin), kann mit dieser Methode auf die Intaktheit und die Kontamination der ursprünglichen RNA mit genomischer DNA geschlossen werden. Bei der durchgeführten PCR, wird als Template die in der Reversen Transkription amplifizierte cDNA nach Verdünnung mit hochreinem Aqua dest. im Verhältnis 1 : 4 verwendet. Die Primer müssen dabei so gewählt werden, dass ihre korrespondierenden Sequenzen in zwei verschiedenen Exonen liegen. Dadurch kann eine Amplifikation von genomischer DNA (Produktgröße entspricht den Exon- und Intronabschnitten) und cDNA (Produktgröße entspricht nur den Exonenabschnitte) unterschieden werden. Die Produkte der PCR werden mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe des Fluor-S MultiImager beurteilt.

## 4.2 Zellbiologische Methoden

### 4.2.1 Auftauen von Zelldauerkulturen

In ein 15 ml Zentrifugengefäß werden 12 ml RPMI 1640 Medium steril abgefüllt und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen wird aus dem Stickstofftank entnommen und unverzüglich in das 37 °C warme Wasserbad überführt. Der Inhalt des Röhrchens wird so lange aufgetaut, bis nur noch wenige Eisreste vorhanden sind. Der komplette Inhalt des Röhrchens (Zellen und Medium) wird in das Zentrifugengefäß mit dem vorgewärmten Medium pipettiert und bei 1500 U/min für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet nach Resuspension mit 15 ml frischem Medium in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt. Die Zellen werden im humidifizierten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden kultiviert. Nach dieser Zeit wird das Medium abgenommen, die Zellen mit neuem Medium gespült und mit 15 ml frischen Medium kultiviert.

### 4.2.2 Kultur von semi-adhärenenten HEK293T-Zellen

Bei der Durchführung der Zellkulturexperimente werden HEK293T-Zellen, die vom Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Walzog im Institut für Physiologie der LMU zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Bei HEK293T-Zellen handelt es sich um eine humane, em-

bryonale Nierenzelllinie, die das SV40-Large-T-Antigen exprimiert (Durocher et al., 2002; Mahon, 2011). In diesen Zellen werden Vektoren mit einem SV40-ORI besonders effektiv abgelesen. Als Medium dient RPMI1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (MEM Non-Essential Amino Acids Solution, MEM NEAA), 1 % einer Antibiotikazubereitung aus Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin und 1 % Natriumpyruvat (Endkonzentration 1 mM), welches sterilfiltriert eingesetzt wird (Zusammensetzung siehe Tab. 4.11).

Die Kultivierung erfolgt in Kulturflaschen aus Polystyrene mit Ventildeckel in den Größen 10 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup>. In Kultur werden die Zellen alle 4 – 5 Tage passagiert. Hierzu wird das alte Medium abgenommen, die semi-adhären Zellen mit 10 ml steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült und mit 5 % igem Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Die Inkubationszeit beträgt ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Neutralisation des Trypsins werden 10 ml frisches serumhaltiges RPMI1640-Medium hinzu gegeben, die Zellen danach in ein 15 ml Zentrifugengefäß überführt und bei 1500 U/min für 5 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird mit 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und ein Teil (5-10 %) in eine neue Kulturflasche mit 10 ml Kulturmedium überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt im humidifizierten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabelle 4.11: Zusammensetzung des Standardkulturmediums**

Komponente	Volumen (ml)
RPMI1640	500
FCS	50
Natriumpyruvat	5
MEM NEAA	5
Penicillin, Streptomycin, L-Glutamin	5
Gesamt	565 ml

### 4.2.3 Mykoplasmentest

Vor Verwendung der Zellen für weiterführende Experimente erfolgt eine Testung auf Mykoplasmen. Hierzu dient das Venor®GeM-Mykoplasmen Detektions Kit. Dieser Test beruht auf dem Nachweis eines Abschnitts der 16S-rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms mittels PCR. Es werden 100 µl des Überstandes abgenommen und fünf Minuten auf 99 °C

zur Lysierung der Mykoplasmen und Inaktivierung vorhandener DNasen erhitzt. Um störende Zelltrümmer zu entfernen, werden die Proben danach bei 13000 U/min für fünf Sekunden zentrifugiert. Für die nachfolgende PCR werden 2  $\mu$ l der Proben eingesetzt. Bei jedem Test wird eine Negativkontrolle, in der der Kulturüberstand durch hochreines Aqua dest. ersetzt wird, und eine im Kit enthaltene Positivkontrolle mit Fragmenten aus Mykoplasmen-DNA mitgeführt. Der Reaktionsansatz sowie die PCR-Bedingungen richten sich nach den Vorgaben des Herstellers.

Nach der PCR wird eine Agarose-Gelelektrophorese wie beschrieben durchgeführt. Zur internen Kontrolle hinsichtlich einer erfolgreichen PCR entsteht auch bei Mykoplasmen negativen Proben ein PCR-Produkt mit einer Größe von 191 bp. Proben, die zusätzlich ein PCR-Produkt mit einer Größe von 267 bp aufweisen, gelten als mit Mykoplasmen kontaminiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden alle mehrfach negativ auf Mykoplasmen getestet.

#### 4.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen geerntet und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Um beim Zählen tote Zellen identifizieren zu können wird eine Probe der Zellsuspension im Verhältnis 1 : 1 mit Trypan-Blau gemischt. Dieser Farbstoff kann nur bei toten Zellen in das Zytoplasma eindringen und sie anfärben. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer erfolgt die Bestimmung der Zellzahl. Die Anzahl der Zellen pro ml errechnet sich aus gemittelte Anzahl der Zellen pro Großquadrat multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor  $10^4$  (Faktor für die Zählkammer, da diese 0,1  $\mu$ l Zellsuspension über einem Großquadrat enthalten).

#### 4.2.5 Anlegen einer Zelldauerkultur

Zur Langzeitaufbewahrung werden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu werden sie wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA abgelöst und gezählt. Nach erneutem abzentrifugieren werden sie in einem speziellen Einfriermedium bestehend aus 70 % RPMI1640-Medium, 20 % FCS und 10 % sterilem Dimethylsulfoxid in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  pro ml gelöst, in einem Kryoröhrchen, das sich in einem Styroporgefäß mit einer 1 cm starken Außenwand befindet, bei -80 °C eingefroren und nach 24 Stunden zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.



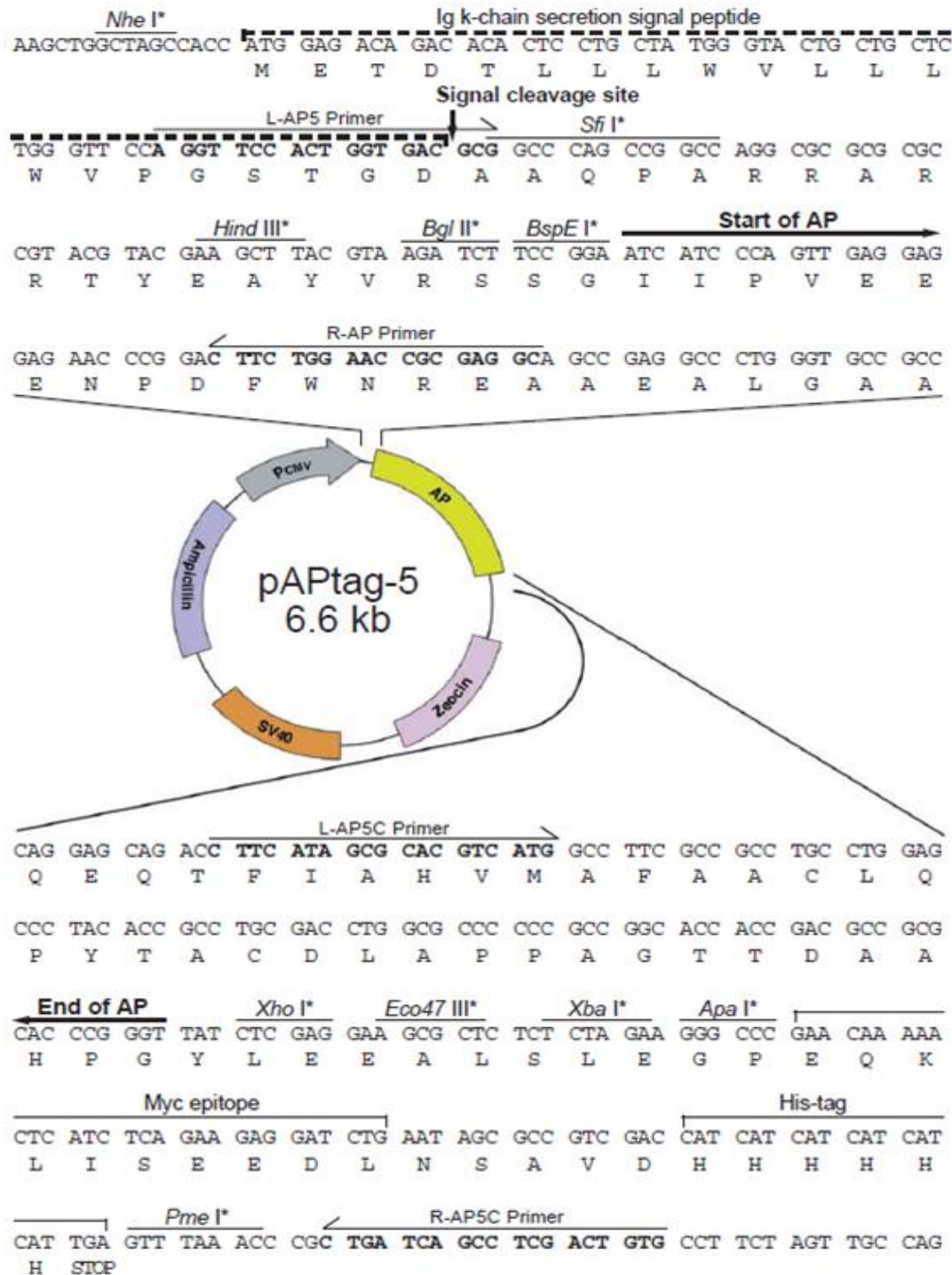
### 4.2.6 Transiente Transfektion

Am Tag vor Beginn der Transfektion werden pro Transfektionsansatz 2 – 3 wells einer 6-well-Kulturplatten mit  $0,5 \times 10^6$  HEK293T-Zellen pro well in 3 ml Medium vorbereitet und 24 Stunden unter Kulturbedingungen kultiviert. Ist am nächsten Tag eine Konfluenz von 80-90 % erreicht, wird die eigentliche Transfektion mit Fugene-HD-Transfektionsreagenz durchgeführt. Hierzu wird zunächst das Kulturmedium vom Vortag aus den wells abgesaugt und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Zur Bildung des Transfektionskomplexes werden pro well 97  $\mu\text{l}$  serumfreies RPMI1640-Medium mit 6  $\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz und 2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro well werden 100  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes in das Medium pipettiert und durch schwenken der Kulturplatte auf den Zellen verteilt. Nach einer Inkubation von 24 - 48 Stunden werden die Zellen entweder geerntet oder das Medium mit dem Transfektionsreagenz wird durch frisches Kulturmedium ersetzt.

### 4.2.7 Nachweis von thermostabiler alkalischen Phosphatase im Überstand transient transfizierter Zellen

In dieser Arbeit wurde der pAPtag-5 Vektor der Firma GenHunter verwendet. Dieser Vektor erlaubt die Fusion von Proteinen mit humaner plazentarer alkalischer Phosphatase (AP), welche sowohl am N-terminalen als auch am C-terminalen Ende des Ausgangsproteins angehängt werden kann. Es wurden 5 Fusionskonstrukte aus CEACAM16 bzw. CEACAM16-Untereinheiten und AP hergestellt. Bei der Expression der Fusionsproteine durch eukaryontische Zellen werden diese aus der Zelle heraus in den Überstand (also das Kulturmedium) sezerniert. Hierbei ist die Signalsequenz, welche für die Sezernierung benötigt wird im Vektor enthalten. In den Fällen, bei denen AP am C-terminalen Ende von CEACAM16 fusioniert wird, wurde die Signalsequenz des Vektors durch die eigene Sequenz des Proteins ersetzt.

Zur Kontrolle der transienten Transfektion von HEK293T-Zellen mit Plasmidkonstrukten aus dem pAPtag-5 Vektor wird ein Assay zum Nachweis von alkalischer Phosphatase (AP) durchgeführt. Der durchgeführte Nachweis orientiert sich am Prinzip eines ELISA mit AP-markierten Antikörpern.

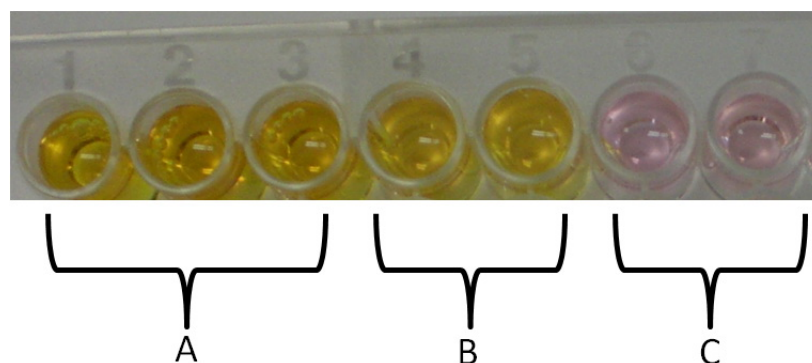


**Abbildung 4.2: Vektorkarte des pAPtag-5 Vektors.** Darstellung des Vektors mit den Restriktionschnittstellen, der Anfangs- und Endsequenz der AP. Dadurch, dass sich sowohl vor als auch nach der Sequenz, welche für die AP kodiert, Restriktionschnittstellen befinden, ist es möglich, das Protein, welches mit der AP fusioniert werden soll, sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus anzuhängen. (Quelle: AP-TAG Kit B Protokoll, GenHunter® Corporation, Nashville, USA)

Nach transienter Transfektion wird das Transfektionsmedium gegen frisches Medium ausgetauscht. Dieses verbleibt vier Tage auf den kultivierten Zellen. Danach werden die Zellüberstände abgenommen und zur Entfernung abgelöster Zellen und Zelltrümmer bei 15000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und durch einen Filter mit einer Porengröße von  $0,45\ \mu\text{m}$  filtriert. Die Pufferung der Lösung erfolgt mit 10 mM HEPES. Zur Konservierung werden 0,05 % Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) hinzugegeben. Zur Verdünnung der Proben dient HBHA-Puffer aus Hank's Balanced Salt Solution,  $0,5\ \text{mg/ml}$  BSA, 20 mM HEPES und 0,5 %  $\text{NaN}_3$ . So behandelt können die Überstände bei  $4\ ^\circ\text{C}$  gelagert werden.

Zur Inaktivierung endogener alkalischer Phosphatase in den Überständen werden diese zehn Minuten auf  $60\ ^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Aktivität der humanen plazentaren alkalischen Phosphatase bleibt dabei auf Grund der Hitzestabilität erhalten. Die Proben werden anschließend im Verhältnis 1 : 1 mit einem Substratpuffer aus 15 ml zweimolarer Diethanolaminlösung,  $15\ \mu\text{l}$  einmolare Magnesiumchloridlösung und 100 mg p-Nitrophenylphosphat versetzt und ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert.

Ist nach der thermischen Inaktivierung noch Phosphataseaktivität vorhanden, lässt sich nach der Inkubation ein Farbumschlag der Proben von einem blassen Lila hin zu einem kräftigen Gelb beobachten (Abb. 4.3). Als Positivkontrolle dient eine Lösung aus Standardmedium und mit alkalischer-Phosphatase-konjugiertem Streptavidin. Als Negativkontrolle wird Überstand von transient transfizierten Zellen, welche natives CEACAM16 exprimieren, verwendet.



**Abbildung 4.3: Nachweis von thermostabiler humaner plazentarer alkalischer Phosphatase.** Durch Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenolat durch die enzymatische Reaktion der alkalischen Phosphatase verändert sich die Farbe der Proben. P-Nitrophenolat erscheint für das menschliche Auge gelb. (A) Positivkontrolle mit Streptavidin-alkalische-Phosphataselsg. (B) Überstand von mit dem pAPtag-5 Vektor transient transfizierten HEK293T-Zellen (C) Negativkontrolle mit Überstand von mit pSport6-murinCeacam16 transient transfizierten Zellen

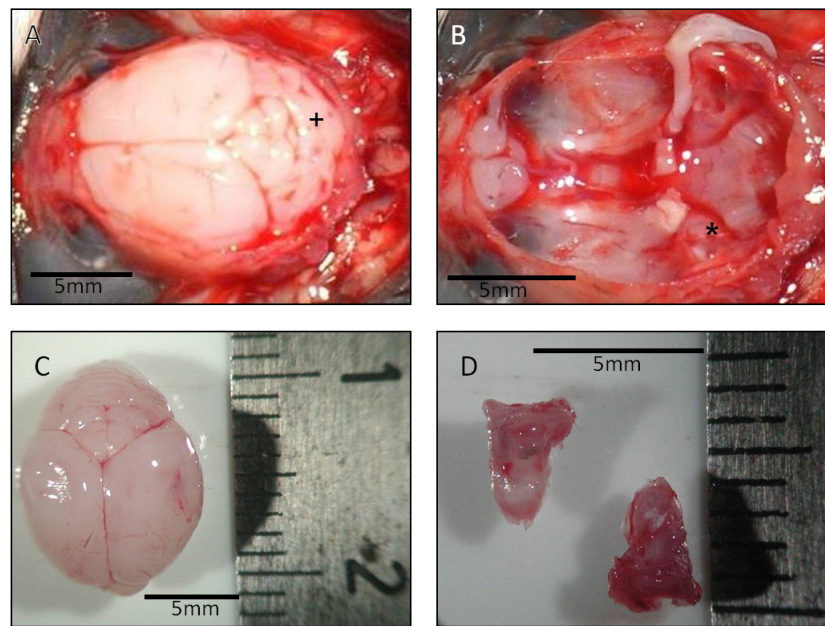
### 4.2.8 Anfertigung von Cytospins

Um Zellen mit immunhistochemischen Methoden anfärben zu können werden Cytospinpräparate hergestellt. Pro Objektträger werden  $4 \times 10^4$  in  $100 \mu\text{l}$  PBS suspendiert. Vor dem Einpipettieren in die Zentrifuge werden die Zellsuspensionen erneut gevortext und durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Mit Hilfe der Shandon-Zentrifuge können ca.  $0,5 \times 10^6$  Zellen auf 12 Glasobjektträger geschleudert werden. Die Cytospins werden 12 - 18 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur immunhistologischen Färbung bei  $-20^\circ\text{C}$  tiefgekühlt, um einen möglichst guten Antigenerhalt zu gewährleisten.

## 4.3 Histologie

### 4.3.1 Gewebeentnahme

Zur Gewebeentnahme werden die Tiere zunächst mit Hilfe von Isofluran betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Kopfhaut wird mittels eines Schnittes vom Nacken der Maus nach vorne zur Nase hin abpräpariert und der Schädel durch einen Schnitt mit einer spitzen Schere vom Foramen magnum aus in Richtung der Augen eröffnet. Das nun freiliegende Gehirn wird im Ganzen entnommen. Für histologische Präparationen bleiben Großhirn und Kleinhirn zusammen. Für die Gewinnung von RNA wird das Kleinhirn vom Großhirn abgetrennt und beides separat voneinander weiter bearbeitet. Die Gewebe werden nach sehr kurzem Spülen in PBS in 4 % Formaldehyd überführt. Von der nun freiliegenden Schädelbasis wird der okzipitale Teil entfernt, um die Felsenbeine präparieren zu können. Hier wird die Cochlea aufgesucht, welche innerhalb einer dünnen blasenartig aussehenden Knochenlamelle liegt. Das Hörorgan wird zusammen mit dem Vestibularorgan en bloc aus dem Knochen herauspräpariert. Hierzu muss mit einer dünnen Pinzette in den Gehörgang eingegangen und das Innenohr fixiert werden, bevor von oben das Felsenbein eröffnet und das gesamte Labyrinth entnommen wird. Auch dieses Gewebe ist nach kurzem Spülen in PBS zur weiteren Fixierung in 4 % Formaldehyd zugegeben (Abb. 4.4).



**Abbildung 4.4: Präparation der murinen Gewebe** (A) Nach der Eröffnung des knöchernen Schädels wird der Blick auf das Gehirn frei, (+) markiert das Kleinhirn; (B) nach der Entfernung des Gehirnes, Blick auf die Schädelbasis, (\*) markiert das Felsenbein mit dem darin eingebetteten Innenohr; (C) entnommenes Mäusegehirn vor der Fixierung; (D) Innenohre nach der Präparation aus dem Knochen, vor Fixierung und Entkalkifizierung. Die entnommenen Gewebe dienen zur Herstellung von Schnittpräparaten sowie zur Isolierung von RNA.

### 4.3.2 Anfertigung histologischer Präparate paraffineingebetteter Gewebe

#### Fixierung und Entkalkifizierung der Gewebe

Die murinen Organe werden nach der Isolation unterschiedlich weiter behandelt. Großhirne und Kleinhirne werden 60 Minuten, Innenohre 30 Minuten in 4 % Formaldehyd fixiert. Danach folgt eine Entkalkifizierung der Innenohre mit EDTA in 20 % Zitronensäure für 12 - 14 Stunden bei Raumtemperatur. Durch diese Maßnahme wird der Knochen schneidbar gemacht. EDTA bildet Komplexe mit den Calciumionen der Knochenmatrix, wodurch sich diese aus ihrer ursprünglichen Verbindung lösen. Dadurch wird die Konsistenz weich und die Gewebe können nach dem Einbetten in Paraffin mit dem Mikrotom geschnitten werden. Bis zur Entwässerung werden die Proben in 70 % Ethanol aufbewahrt.

#### Entwässerung der Gewebeproben

Nach der Fixierung werden die Gewebe im Entwässerungsautomaten Hypercenter XP der Firma Shandon nach dem in Tabelle 4.12 aufgeführten Protokoll entwässert und mit Paraffin durchtränkt:

**Tabelle 4.12: Entwässerungsprotokoll**

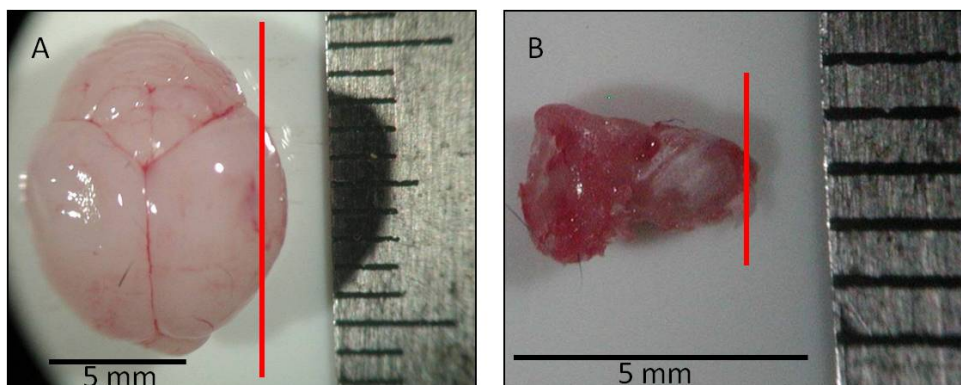
Reagenz	Temperatur °C	Inkubationszeit
70 % Ethanol	22	1x 2h + 1x 1h
96 % Ethanol	22	3x 1h
100 % Ethanol	22	3x 1h
Roti®-Histol	22	2x 1,5h
Paraffin	60	2x 1,5h

Nach Ablauf der Entwässerung bis zur Einbettung in Paraffinblöcke verbleiben die Proben in flüssigem Paraffin bei 60 °C, um sie vor dem Austrocknen zu schützen.

### Einbettung der Gewebe in einen Paraffinblock

Im Anschluss an die Entwässerung werden die Organe in Paraffinblöcke eingebettet. Die Orientierung wird dabei so gewählt, dass von Großhirn und Kleinhirn Sagittalschnitte angefertigt werden können. Bei den Innenohren wird die Cochlea wie in Abbildung 4.5 dargestellt in Richtung der Schnittebene im Block orientiert.

Zum Einbetten werden vorgewärmte Metallgussformen mit 60 °C warmem flüssigen Paraffin gefüllt. Die Gewebe werden entsprechend der Orientierung auf dem Boden der Form platziert, welcher beim fertigen Block der Schnittebene entspricht. Der Block wird zum Auskühlen auf Eis gestellt und nach vollständigem Erkalten aus der Form gelöst.



**Abbildung 4.5: Orientierung der Organe im Paraffinblock** Dargestellt ist die Orientierung der Gewebe beim Einbetten in die Paraffinblöcke. Die roten Linien markieren die Schnittebene, in welcher beim Schneiden der Blöcke mit dem Mikrotom die histologischen Präparate erzeugt werden. (A) murines Gehirn mit Kleinhirn (B) murines Innenohr mit Cochlea und Bogengängen



### Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke mit den darin enthaltenen Geweben werden für 30 Minuten auf Eis vorgekühlt. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms werden 3 – 5  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt und diese für zwei bis vier Minuten in ein 39 °C warmes Wasserbad zum Strecken überführt. Aus diesem werden Schnitte auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Wir bevorzugen die Verwendung dieser speziell beschichteten Objektträger, da die Haftung der sehr kleinen Gewebe auf unbeschichteten Objektträgern für die Immunhistologie nicht ausreichend ist. Die Objektträger werden bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss bei ca. 50 °C für mehrere Stunden inkubiert.

### 4.3.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

Bei der Herstellung von Gefrierschnitten erfolgt keine Formalinfixierung der Gewebe, sondern ein schonendes Tiefgefrieren sofort nach der Entnahme. Hierzu wird ein Kryoröhrchen in einem mit Dimethylbutan gefüllten Gefäß in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Gewebeprobe wird in das vortemperierte Kryoröhrchen gegeben und so langsam heruntergekühlt. Kurzfristig können die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert werden, die längerfristige Aufbewahrung erfordert Temperaturen von -80 °C.

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten werden die Gewebe in das Gefriermikrotom (Kryostat) verbracht. Zur Einbettung wird Tissue-Tek<sup>TM</sup>O.C.TTM Einbettmedium verwendet. Die Schnitte werden in einer Dicke von 4-7  $\mu\text{m}$  angefertigt, auf Superfrost Objektträger aufgezogen und mehrere Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die längerfristige Lagerung der Schnitte erfolgt bei -80 °C. Um den Strukturhalt beurteilen zu können, wird bei einzelnen Schnitten eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt.

### 4.3.4 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Paraffinschnitte werden zunächst nach der Hämatoxilin-Eosin-Methode (HE) gefärbt. Hierzu dient der Färbeautomat Combitec Slide Stainer 4009 mit dem in Tabelle 4.13 aufgeführten Färbeprotokoll. Die Färbung mit Hilfe des Automaten ermöglicht ein gleichmäßiges eintauchen der Schnitte in die unterschiedlichen Lösungen und erzeugt so reproduzierbar gute Färbeergebnisse mit gleichmäßiger Färbung.

**Tabelle 4.13: Färbeprotokoll der HE-Färbung**

Reagenz	Eintauchzeit
<i>Entparaffinnierung:</i>	
Roti®-Histol	2 x 3 min
100 % Ethanol	2 x 3 min
96 % Ethanol	3 min
70 % Ethanol	3 min
<i>Färbung:</i>	
Hämalaun	9 min
fließendes Leitungswasser	6 min
Eosin (0,5 % in wässiger Lsg.)	3 x 3 min
Aqua dest.	3 min
<i>Entwässerung:</i>	
100 % Ethanol	3 x 3 min
Roti®-Histol	2 x 3 min

Nach der Färbung werden die Schnitte mit DPX Einbettmedium eingedeckt.

### 4.3.5 Immunhistologie und Immunzytologie

Zur Färbung von Paraffin- und Kryoschnitten werden das Mouse-to-Mouse IHC Detection System Kit, das ImmPRESS®Kit sowie Färbungen nach der Avidin-Biotin-Methode verwendet. Für Cytospins kommen nur die beiden letztgenannten Methoden zum Einsatz.

#### Vorbereitung der Gewebeschnitte

Paraffinschnitte werden zunächst mit Xylol (Rotihistol®) entparaffiniert und anschließend wird die Rehydrierung der Gewebe durch Inkubation in absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 % und 75 % Ethanol) und in Aqua dest. durchgeführt. Darauf folgt ein Antigen Retrieval mit Tris/EDTA pH 9,0 (Target Retrieval Solution), um die Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens zu ermöglichen. Hierbei werden die Schnitte in der Retrieval Lösung in einer Mikrowelle bis kurz vor den Siedepunkt erhitzt und dann für ca. 30 Minuten auf dieser Temperatur gehalten. Danach folgt die Abkühlung der Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Spülen der Schnitte mit PBS erfolgt die Blockierung der endogenen Peroxidase durch zehnminütige Inkubation in einer



Lösung aus 80 ml PBS, 10 ml 90 % Methanol und 10 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Raumtemperatur. Kryoschnitte und Cytospins werden nach dem Auftauen und Trocknen für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur 10 Minuten mit Aceton fixiert.

### **Färbung mit Hilfe des Mouse-to-Mouse IHC Detection System Kit**

Für die Färbung muriner Gewebe mit unmarkierten murinen Antikörpern oder Immunsereen wird das Mouse-to-Mouse IHC Detection System Kit verwendet. Dadurch wird der Hintergrund der bei der Anwendung von murinen Primärantikörpern auf Mausgeweben entstehen kann reduziert. Durch die Anwendung einer Blockierungslösung, welche unmarkierte Anti-Ig Antikörper enthält, werden endogene Antikörper im Gewebe blockiert und diese dadurch bei der Anwendung des markierten Sekundärantikörpers nicht detektiert. Diese Blockierungslösung wird auf die Schnitte gegeben und dort 60 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Es folgt dreimaliges Waschen mit PBS. Die Inkubationszeit und Inkubationsbedingungen des Erstantikörpers (Konzentration 20  $\mu\text{g/ml}$ ) wird je nach Antikörper variiert. So verbleibt der monoklonale Anti-CEACAM16 Antikörper 9D5 für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitten. Für eine Färbung mit murinem Immunsereum bzw. Präimmunsereum gegen CEACAM16 wird die Inkubation 12 - 14 Stunden bei 4 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Negativkontrollen erfolgen mit murinem Präimmunsereum, dem MOPC-Antikörper in einer Verdünnung 10  $\mu\text{g/ml}$  sowie einem Immunsereum gegen ein in den Geweben nicht enthaltenes Antigen (CEACAM20). Nach dreimaligem Spülen mit PBS erfolgt die Inkubation mit der Post-Antibody Blocking Solution für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgen drei Waschschritte nach denen die Schnitte mit Poly-HRP-Anti Mouse/Rabbit IgG Sekundärantikörper für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgt die Färbung für 15 Minuten mit Peroxidasesubstratlösung (Zusammensetzung siehe Tab. 4.14). Hierbei entstehen durch Reaktion der Horseradish peroxidase (HRP) mit dem in der Peroxidasesubstratlösung enthaltenen Wasserstoffperoxid Protonen, welche durch Oxidation von Amino-Ethyl-Carbemazol eine rotbraune Färbung hervorrufen.

**Tabelle 4.14: Peroxidasesubstratlösung**

Komponente	Menge/Volumen
Amino-Ethyl-Carbemazol	16 mg
Dimethylformamid	4 ml
Acetat-Puffer	46 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	60 $\mu$ l

### Färbung mit ImmPRESS®System

Zuerst erfolgt eine Proteinblockierung mit 2,5 % Pferdeserum für 20 Minuten. Zur Inkubation mit dem Erstantikörper wird dieser in PBS verdünnt und zwei Stunden bei Raumtemperatur oder für 12 - 14 Stunden bei 4 °C in einer feuchten Kammer auf den Gewebeschnitten oder Cytospins belassen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Pferd-Anti-Maus-Antikörper (ImmPRESS®, Vector). Zur Anfärbung wurden die Schnitte mit der in Tabelle 4.14 beschriebenen Peroxidasesubstratlösung für 15 Minuten inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationen erfolgten immer drei Waschschritte mit PBS. Beim ImmPRESS®System wird eine höhere Peroxidaseaktivität durch eine Kopplung von Peroxidasemicropolymeren an einen Sekundärantikörper erreicht. Hieraus resultiert bei geringem Antigenvorkommen ein höheres Färbesignal als bei einer einfachen Kopplung des Sekundärantikörpers an Meerrettichperoxidase.

### Färbung nach der Avidin-Biotin-Methode

Zusätzlich zur Proteinblockierung mit Pferdeserum wird eine Blockierung des endogenen Biotins mit Hilfe des Streptavidin/Biotin-Blocking Kits durchgeführt. Hierbei werden die Schnitte zunächst 15 Minuten mit einer Streptavidin Lösung und anschließend 15 Minuten mit einer Biotin Lösung inkubiert. Darauf folgt die Inkubation mit dem biotinylierten Erstantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Statt eines Sekundärantikörpers wird eine Detektionslösung mit HRP konjugiertes Streptavidin in einer Konzentration von 0,002  $\mu$ g/ $\mu$ l (verdünnt mit PBS mit 0,1 % BSA) auf die Schnitte gegeben und eine Stunde belassen. Durch den Zusatz von BSA wird die unspezifische Anhaftung des HRP-Streptavidin-Proteins an die Beschichtung der Objektträgeroberfläche reduziert. Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zwischen den einzelnen Inkubationen werden die Schnitte immer drei Mal mit PBS

gespült. Anschließend werden die Schnitte wie oben beschrieben mit Peroxidasesubstratlösung gefärbt. Bei diesem Protokoll ist es nicht notwendig, den Primärantikörper mit einem Sekundärantikörper zu detektieren. Es kann somit ein in der Maus hergestellter Antikörper auf murinen Geweben eingesetzt werden, ohne die Problematik der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers an im Gewebe enthaltene Immunglobuline berücksichtigen zu müssen. Allerdings ist eine Biotinmarkierung des Erstantikörpers notwendig. Es wird daher für die Anwendung des biotinylierten murinen Antikörpers 9D5 auf murinen Geweben verwendet.

### **Gegenfärbung und Eindeckeln der Präparate**

Nach der immunhistologischen Färbung werden die Schnitte mit Hämalaun zur Anfärbung der Zellkerne gegengefärbt. Nach 5 Minuten Spülung in fließendem Leitungswasser zur Entwicklung der blauen Färbung des Hämalauns werden die Schnitte mit Aquatex® eingedeckelt.

## **4.4 Nachweis des homophilen Interaktionspotentials von CEACAM16 (Zelladhäsionsmodell)**

Zur Betrachtung der Fähigkeit von CEACAM16 zur homophilen Bindung wurde ein neuartiges Nachweisverfahren entwickelt. Dieses Verfahren beruht auf einer Methode, die auch für den Nachweis der homophilen und heterophilen Zelladhäsion von CEA, durch den Vergleich der Zell-Zelladhäsion (Aggregatbildung) von CEA-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen, benutzt wurde (Benchimol et al., 1989). Soll dieses Nachweisprinzip auf CEACAM16 angewendet werden, muss CEACAM16 zellmembranverankert exprimiert werden. Dazu wurden Vektoren hergestellt die sowohl das murine ((Krupar, 2012)) als auch das humane (Aldevron, Freiburg, unveröffentlicht) CEACAM16 mit einem GPI-Ankersignal verbindet. HEK293T-Zellen werden dann mit diesen Vektoren transient transfiziert. Für die Transfektion sind Bedingungen die zu einer CEACAM16-GPI Fusionsprotein-Expression bei bis zu 50 % der Zellen führen, zu wählen. Die Zellen werden anschließend geerntet und in PBS auf eine Konzentration von 400 Zellen/ $\mu$ l eingestellt. Durch vermehrtes Pipettieren wird eine Vereinzelung der Zellen erreicht. Nach Inkuba-

tionszeiten von 0, 15, 30 und 60 Minuten bei Raumtemperatur werden Cytospins der Zellsuspensionen angefertigt. Danach erfolgt die immunzytologische Färbung der Cytospins mit dem monoklonalen Antikörper 9D5 sowie dem gegen murines CEACAM16 gerichteten Immunsereum. Im Anschluss werden die Cytospins hinsichtlich der Verteilung der CEACAM16-GPI positiven und negativen Zellen beurteilt. Für eine Adhäsionsfunktion von CEACAM16 spricht, wenn CEACAM16-GPI exprimierende Zellen zu einer stärkeren Aggregatbildung als CEACAM16-GPI negative Zellen neigen. Optional können die Proben nach der Inkubationszeit und vor der Anfertigung von Cytospins mechanischem Stress in Form von invertieren des Reaktionsgefäßes bzw. Verwirbelung ausgesetzt werden, um die Stabilität der Bindung zu überprüfen.

# 5 Ergebnisse

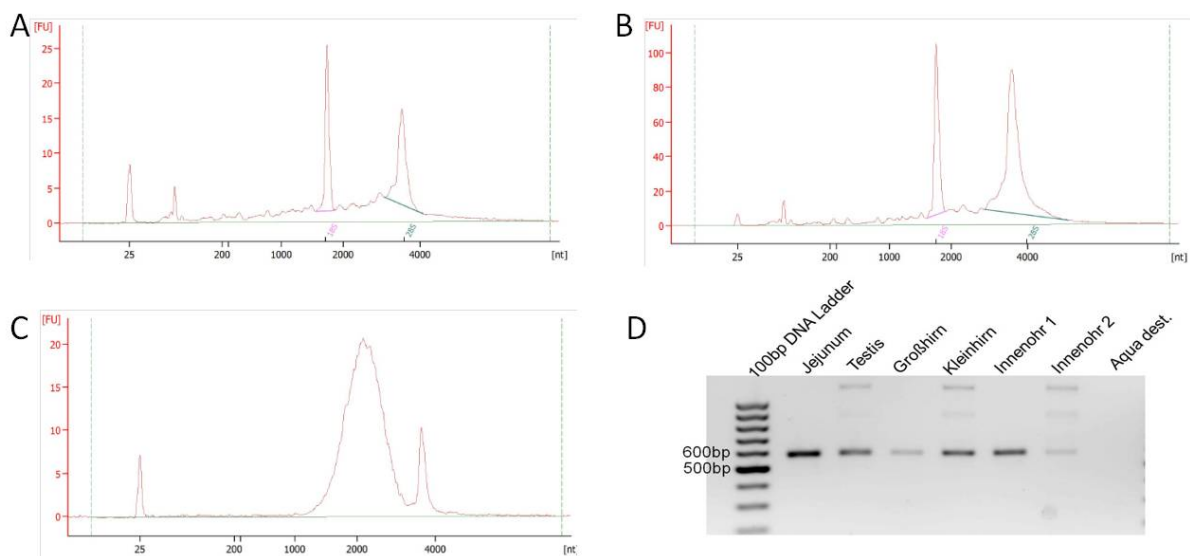
## 5.1 Proteininteraktion von CEACAM16

### 5.1.1 Koexpression von CEACAM16 mit weiteren Mitgliedern der CEA-Familie

Wir hatten deutliche Hinweise, dass CEACAM16 vor allem im Innenohr und im Gehirn exprimiert wird. EST-Datenbank-Analysen konnten nicht eindeutig zwischen einer Expression im Groß- oder Kleinhirn unterscheiden. Da die Mitglieder der CEA-Familie häufig untereinander wechselwirken untersuchten wir, ob andere Mitglieder der Proteinfamilie mit CEACAM16 koexprimiert werden und somit als potenzielle Interaktionspartner zur Verfügung stünden. Besonders CEACAM1 kommt aufgrund seiner Expression in verschiedenen Geweben und Zelltypen und dem Vorhandensein orthologer Gene bei Mensch und Maus in Betracht. Wir isolierten daher RNA aus murinen Innenohren, Groß- und Kleinhirnen. Die Isolierung der RNA in ausreichenden Mengen aus dem Innenohr stellte sich, aufgrund der Affinität der RNA zum Hydroxylapatit des Knochens als sehr schwierig heraus. Hierdurch verringert sich sowohl die Gesamtmenge als auch die Qualität der RNA. Dies spiegelte sich in den durchgeführten Analysen mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer wieder. Die RNA Integrity Number (RIN) nahm für Innenohrproben einen Wert von 2,6 an, was einer schlechten Qualität entspricht. Für Kleinhirnproben konnte eine RIN von 7,8 und für Großhirnproben von 9,4 erreicht werden, was annähernd optimaler Qualität entspricht (Abb. 5.1 A-C).

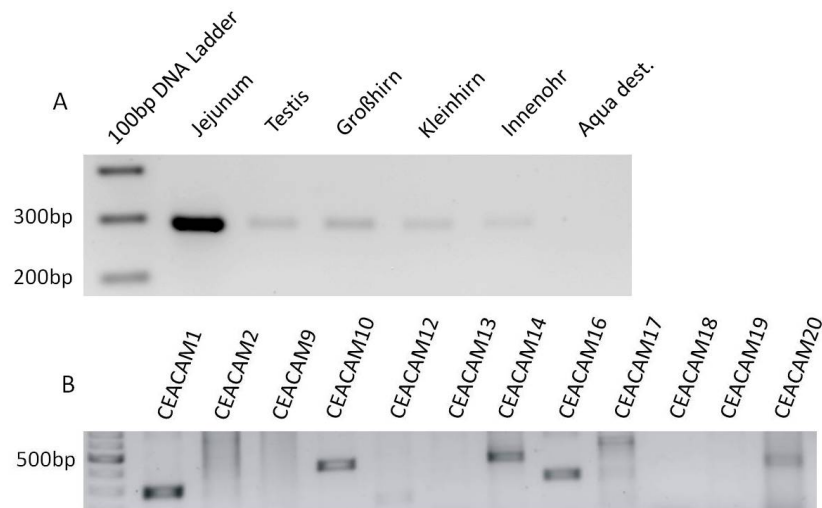
Um die Brauchbarkeit der aus den Geweben extrahierten RNA weiter zu überprüfen, wurde mittels reverser Transkription komplementäre cDNA hergestellt und anschließend eine PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Das  $\beta$ -Aktin-Gen diente dabei als Vorlage. Man kann davon ausgehen, dass bei vorhandener intakter  $\beta$ -Aktin-mRNA auch die gesamte RNA nicht zu stark degradiert ist. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass bei der Verwendung von cDNA ein PCR-Produkt mit einer Größe von 569 bp entsteht. Prozessierte Pseudogene werden mit den gewählten Primern nicht amplifiziert. Sollte die RNA stark degradiert sein, würden nur

wenige PCR-Produkte mit der zu erwartenden Größe entstehen und die entsprechende Bande im Agarosegel daher nur schwach ausfallen. Als Kontrollen wurden RNA-Proben aus murinem Jejunum und murinem Testis, deren Qualität bekannt ist, mitgeführt. Es zeigte sich, dass die gewonnene RNA ausreichend gering degradiert war und somit für weitere Untersuchungen verwendet werden konnte (Abb. 5.1 D). Für die Innenohr2-Probe zeigt sich eine Bande bei 569 bp. Diese stellt sich aber im Vergleich zu den Proben mit bekannter guter Qualität wesentlich schwächer dar, was sich mit den Ergebnissen der Agilent-Analyse deckt, wo diese Probe bereits eine schlechte RIN erreicht hatte. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass diese Probe nicht für weitere Untersuchungen geeignet ist. Eine bessere RNA-Qualität ließe sich durch weniger starkes Zerkleinern der Innenohren erreichen.



**Abbildung 5.1: Überprüfung der RNA-Qualität** (A-C) Kapillarelektrophorese in Verbindung mit fluoreszenz-basierter Quantifizierung in Diagrammdarstellung, RNA aus murinen Geweben; (A) Gehirn (B) Kleinhirn (C) Innenohr; Es zeigt sich eine wesentlich schlechtere Qualität der aus Innenohren gewonnenen RNA (RIN 2,6) im Vergleich zur der aus Großhirn (RIN 9,4) und Kleinhirn (RIN 7,8). Die mindere Qualität zeigt sich in einem breitbasigen Peak im Bereich der 18S-RNA und dem niedrigen Peak im Bereich der 28S-RNA. (D) Nachweis von  $\beta$ -Aktin-cDNA mittels RT-PCR und Agarosegelelektrophorese zur Beurteilung der Kontamination der RNA-Proben mit genomischer DNA. Proben aus Dünndarm (Jejunum) und Hodengewebe (Testis) dienen als Positivkontrolle, destilliertes Wasser (Aqua dest.) als Negativkontrolle. Die Proben aus Dünndarm und Hodengewebe zeigen deutliche Bänder bei einer Größe von 569 bp, ebenso wie die Proben aus Groß- und Kleinhirn sowie der Innenohr1-Probe. Bei der Innenohr2-Probe zeigt sich eine schwache Bande bei 569 bp. Dies bestätigt die hohe Degradierung dieser Probe. Die hohen Bänder in den Testis-, Kleinhirn- und Innenohr2-Proben deuten auf eine Kontamination mit genomischer DNA hin. Ladder: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

Mit den oben in Abbildung 5.1 dargestellten cDNA-Proben, mit Ausnahme der Innenohr2-Probe, wurde eine PCR zum Nachweis von CEACAM1-cDNA durchgeführt, da für dieses Mitglied der CEA-Familie ein sehr breites Expressionsspektrum bekannt ist. Als Positivkontrolle dienten Proben aus Jejunum und Testis. Es konnte eine Expression von CEACAM1 im Großhirn, Kleinhirn und Innenohr nachgewiesen werden, wobei diese in allen drei Geweben als schwach anzusehen ist (Abb. 5.2 A). CEACAM1 stünde also theoretisch sowohl im Kleinhirn als auch im Innenohr für eine Interaktion mit CEACAM16 zur Verfügung. Ein definitiver Nachweis einer Expression von CEACAM16 im Großhirn gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht.



**Abbildung 5.2: Koexpression von CEACAM16 und Mitgliedern der murinen CEACAM-Familie** (A) Nachweis von CEACAM1-cDNA in Kleinhirn, Großhirn und Innenohr. Die Expression ist dabei als eher gering anzusehen. Als Positivkontrolle dienten Proben aus Jejunum und Testis. Die Negativkontrolle bildete Aqua dest. Ladder: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; (B) Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit cDNA aus murinen Innenohrgeweben zum Nachweis von Mitgliedern der murinen CEACAM-Familie. Es konnte cDNA von CEACAM1, CEACAM10, CEACAM14, CEACAM16, CEACAM17 und CEACAM20 nachgewiesen werden. Ladder: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

Nachdem die Koexpression von CEACAM1 und CEACAM16 im Innenohr nachgewiesen werden konnte, dehnten wir die Untersuchung auf die anderen Mitglieder der Proteinfamilie aus. Dies erfolgte analog zum Nachweis von CEACAM1. Die Primer der durchgeführten PCRs für die einzelnen CEACAMs wurden hierbei aus vorherigen Expressionsanalysen übernommen (Zebhauser et al., 2005), sodass die Reaktionsbedingungen und die zu erwartenden Produktgrößen bekannt waren. Eine Liste der Sequenzen ist im Kapitel 3.6

zu finden. Zusätzlich zu CEACAM16 und CEACAM1 konnte mittels RT-PCR die cDNA von CEACAM10, CEACAM14, CEACAM17 und CEACAM20 in der Innenohr-cDNA nachgewiesen werden (Abb. 5.2B). Um unter anderem die Bedeutung dieser Koexpression genauer einordnen zu können, war jedoch die genaue Kenntnis der Proteinlokalisierung von CEACAM16 entscheidend.

## 5.2 Lokalisation des CEACAM16-Proteins

### 5.2.1 Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 9D5

Um die Lokalisation des CEACAM16-Proteins in humanen Geweben zu bestimmen und funktionelle Untersuchungen mit dem humanen Protein durchführen zu können, wurde ein monoklonaler Antikörper (9D5) gegen humanes CEACAM16 hergestellt. Der Antikörper wurde mittels genetischer Immunisierung von Mäusen in Zusammenarbeit mit der Firma Aldevron (Freiburg) entwickelt. Über die Methode der genetischen Immunisierung können Antikörper gegen Proteine hergestellt werden, sobald die cDNA des entsprechenden Gens kloniert wurde. Eine *in vitro* Expression und Aufreinigung des Zielproteins ist nicht notwendig.

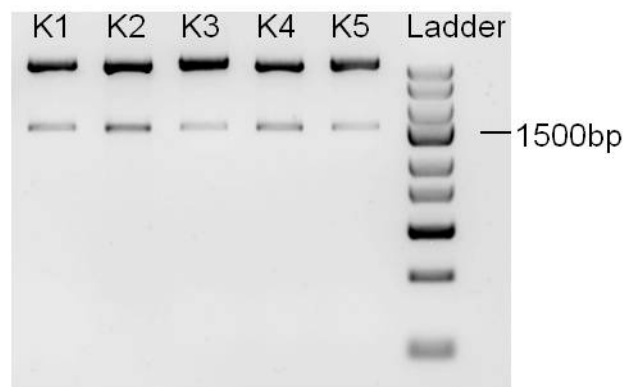
#### Umklonierung der humanen CEACAM16 cDNA

Zur Spezifitätskontrolle des Antikörpers 9D5 in immunzytologische Untersuchungen wurde zunächst die cDNA in einen von eukaryontischen Zellen exprimierbaren Vektor umkloniert, um ein Zellsystem aufbauen zu können, in dem das humane CEACAM16 in seiner natürlichen Form vorliegt. Ausgehend von einem Klonierungsvektor pSC-A-hCEACAM16 sollte die CEACAM16-cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor pRc/CMV kloniert werden. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Hind III und Xba I, deren Schnittstellen sich im multiplen Klonierungsbereich beider Vektoren befinden, wurde die CEACAM16-cDNA aus dem Vektor geschnitten und mit dem zuvor mit den gleichen Enzymen in einem Doppelverdau vorbereiteten pRc/CMV Vektor ligiert. Es folgte die Transformation von XL1-Blue-kompetenten Bakterien mit dem Ligationsprodukt. Es wurden mehrere Klone von der Kulturplatte gepickt und in Selektionsmedium mit Ampicillin angezüchtet. Anschließend folgte die Aufreinigung des Plasmids. Der korrekte Einbau der Zielsequenz



wurde durch Kolonie-PCR der nach der Transformation gewachsenen Klone (Kap. 4.1.1, Abb. 4.1) und durch einen Verdau des isolierten Vektors mit den bei der Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen überprüft (Abb. 5.3). Hierbei zeigte sich, dass alle 5 ausgewählten Klone einen Vektor mit korrekt inserierter humaner CEACAM16-cDNA aufgenommen hatten.

Aus den Bakterienklonen 2 und 5 wurden Glycerindauerkulturen angelegt und bei -80 °C gelagert. Für alle weiteren Experimente wurde das gereinigte Plasmid aus Klon 2 eingesetzt.

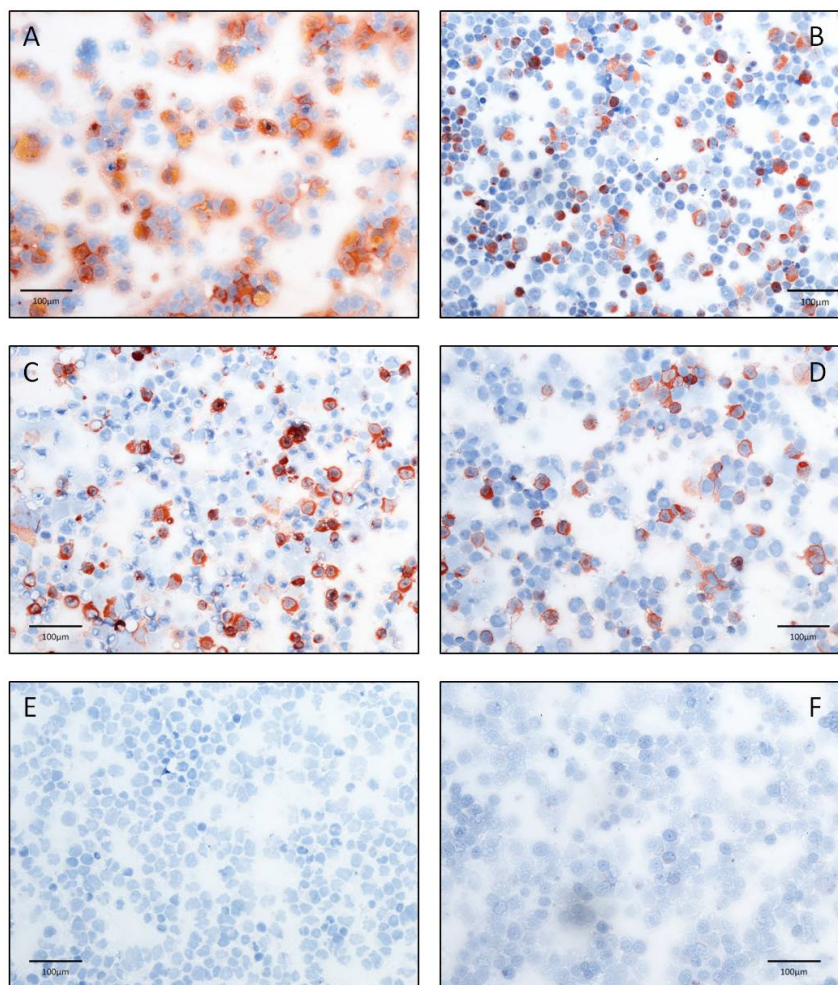


**Abbildung 5.3: Kontrollverdau des pRc/CMV-hCEACAM16 Vektors.** Eine Bande bei einer Größe von 1549 bp zeigt das Vorhandensein von CEACAM16-cDNA im Expressionsvektor an. Die Bande bei 5426 bp entspricht dem linearisierten Vektor. Ladder: GeneRuler Express Ladder. K = Klon

### Untersuchungen zur Spezifität des Anti-CEACAM16 Antikörpers 9D5

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von humanem und murinem CEACAM16 vermuteten wir, dass eine Reaktivität des monoklonaler Antikörper sowohl für das humane als auch für das murinen CEACAM16 besteht. Um dies zu untersuchen wurden HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pSport6-mCEACAM16 (murines CEACAM16) und pRc/CMV-hCEACAM16 (humanes CEACAM16) transient transfiziert und anschließend von diesen Zellen Cytospins angefertigt. Bei der immunzytologischen Färbung diente ein polyklonales Immunsereum gegen murines CEACAM16, das mit dem humanen CEACAM16 kreuzreagiert, als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurden Zellen, welche mit dem Vektor ohne Insert transfiziert wurden, verwendet. Abbildung 5.4 zeigt durch die Braunfärbung der Zellen, dass der Antikörper das native humane Protein zuverlässig erkennt. Durch den Vergleich mit der Negativkontrolle kann eine unspezifische

Bindung des Antikörpers ausgeschlossen werden. Interessanterweise werden auch Zellen, welche das murine CEACAM16 exprimieren vom Antikörper erkannt. Dies zeigt, dass der monoklonale Antikörper 9D5 auch für Untersuchungen des murinen CEACAM16 geeignet ist. Aufgrund der transienten Transfektion sind in den Zellpräparationen auch negative Zellen, welche das Plasmid nicht aufgenommen haben, vorhanden. Die CEACAM16 positiven Zellen zeigen sowohl beim humanen als auch beim murinen Protein eine rein zytoplasmatische Färbung, eine typische Beobachtung bei sezernierten Proteinen.

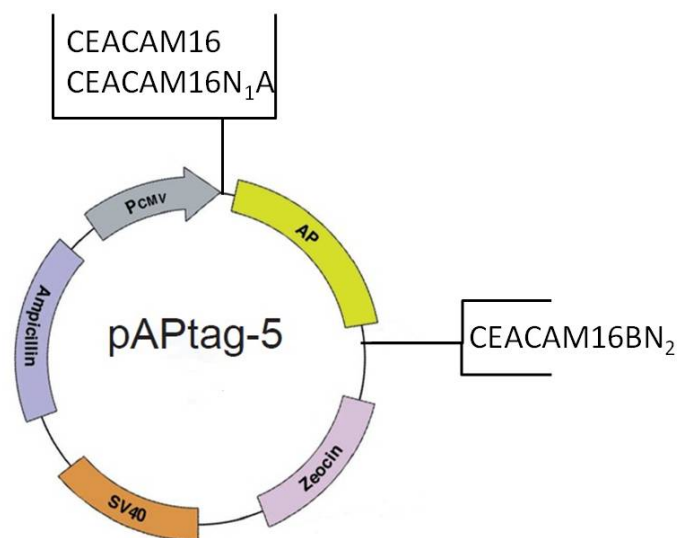


**Abbildung 5.4: Spezifität des monoklonalen Antikörpers 9D5** Cytospins von HEK293T-Zellen, welche transient mit den Vektoren pRc/CMV-hCEACAM16 (A, B) und pSport6-mCEACAM16 (C, D) und einem Vektor ohne Insert (E, F) transfiziert wurden. Anschließend erfolgte die immunzytologische Anfärbung mit dem monoklonalen Antikörper 9D5 in einer Verdünnung von 1:500 (A, C, E) und polyklonalem Immunsereum gegen murines CEACAM16 in einer Verdünnung von 1:300 in PBS (B, D, F). Der monoklonale Antikörper zeigt Kreuzreaktivität mit murinem CEACAM16 (C). Auch das polyklonale Immunsereum erkennt sowohl das humane als auch das murine Protein (B). Die mit einem Leervektor transfizierten Zellen werden weder von dem monoklonalen Antikörper noch von dem polyklonalen Serum erkannt (E, F). Alle Anfärbungen zeigen eine rein zytoplasmatische Färbung, wie dies für sezernierte Proteine typisch ist (A-D)

## Eingrenzung des Bindungsepitops

### Entwurf von Fusionskonstrukten aus CEACAM16 und alkalischer Phosphatase

Zur Eingrenzung des Bindungsepitops des monoklonalen Anti-CEACAM16 Antikörpers 9D5 wurden CEACAM16-Untereinheiten an alkalische Phosphatase gekoppelt. Dies erfolgte mit Hilfe des pAPtag-5 Vektors (GenHunter Corporation, Nashville, USA). Durch die Fusion war es möglich den Erfolg der transienten Transfektion auf einfache Weise zu überprüfen. Abbildung 5.5 zeigt die Vektorkarte mit den Insertionsstellen am C- und am N-Terminus der alkalischen Phosphatase. Die Fusionskonstrukte sollten darüber hinaus im Rahmen einer Kooperation an D.J. Hill (University of Bristol) weitergegeben werden. Des weiteren sollten die Fusionskonstrukte die Möglichkeit bieten, in weiterführenden Untersuchungen potenzielle Liganden von CEACAM16 zu identifizieren.

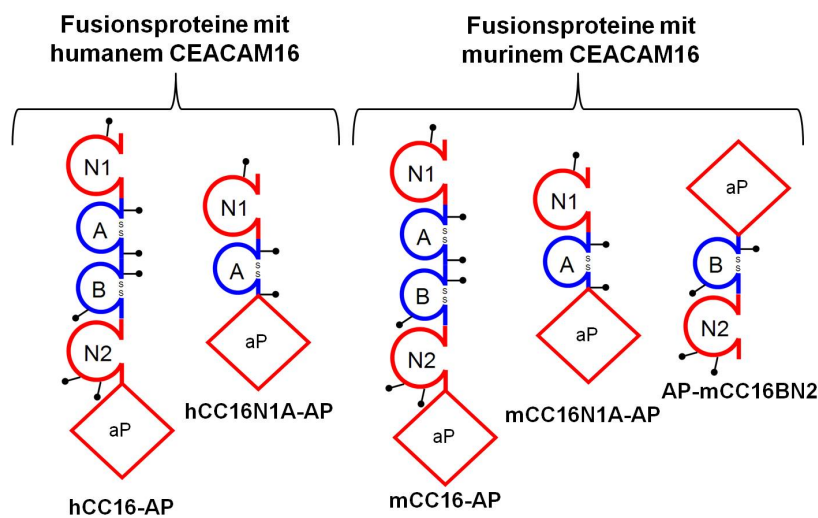


**Abbildung 5.5: Konstruktion der pAPtag5-Vektor basierten Vektoren.** Vektorkarte des pAPtag5-Vektors mit zusätzlich eingezeichneten Platzierungen der CEACAM16-cDNA-Fragmente. AP = humane plazentare alkalische Phosphatase, Zeocin und Ampicillin = Resistenzgene gegen Zeocin und Ampicillin zur Selektion nach Transfektion und Transformation (Quelle: modifiziert nach AP-TAG Kit B Protokoll, GenHunter® Corporation, Nashville, USA)

Es wurden sowohl Vektoren konstruiert, welche für Fusionsproteine aus murinem CEACAM16 als auch solche für Fusionsproteine aus humanem CEACAM16 kodieren. Insgesamt wurden zur Eingrenzung des Bindungsepitopes und für weiterführende Untersuchungen 5 unterschiedliche Konstrukte entworfen:

1. **mCC16-AP** (pAPtag-5-mCC16-AP): murine CEACAM16 full length cDNA fusioniert mit alkalischer Phosphatase am C-terminalen Ende
2. **mCC16N1A-AP** (pAPtag-5-mCC16N1A-AP): N1 und A Domäne des murinen CEACAM16 fusioniert mit der alkalischen Phosphatase am C terminalen Ende
3. **AP-mCC16BN2** (pAPtag-5-AP-mCC16BN2): B und N2 Domäne des murinen CEACAM16 fusioniert mit der alkalischen Phosphatase am N terminalen Ende
4. **hCC16-AP** (pAPtag-5-hCC16-AP): humane CEACAM16 full length cDNA fusioniert mit alkalischer Phosphatase am C terminalen Ende
5. **hCC16N1A-AP** (pAPtag-5-hCC16N1A-AP): N1 und A Domäne des humanen CEACAM16 fusioniert mit alkalischer Phosphatase am C terminalen Ende

In Abbildung 5.6 sind schematisch die Fusionsproteine aus CEACAM16 und humaner plazentarer alkalischer Phosphatase dargestellt.



**Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der Fusionsproteine aus humanem bzw. murinem CEACAM16 und alkalischer Phosphatase (AP).** Dargestellt sind die oben aufgeführten Fusionsproteine mit humanem (h) bzw. murinem (m) CEACAM16 (CC16). Die alkalische Phosphatase wurde alternativ mit dem C-terminalen Ende des full length Proteins bzw. der A-Domäne oder am N-terminalen Ende der B-Domäne fusioniert.

Die unterschiedlichen Teilsequenzen wurden mit Hilfe einer PCR, bei der die CEACAM16-cDNA als Vorlage diente, amplifiziert. Um cDNA-Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen am 5' und 3' Ende zu generieren, wurden den Primern die Restriktionsschnittstellen der Restriktionsendonukleasen, welche bei der Klonierung der PCR-Produkte in die Vektoren verwendet werden sollten, am 5' bzw. 3' Ende angefügt. Die Enzyme NheI und HindIII

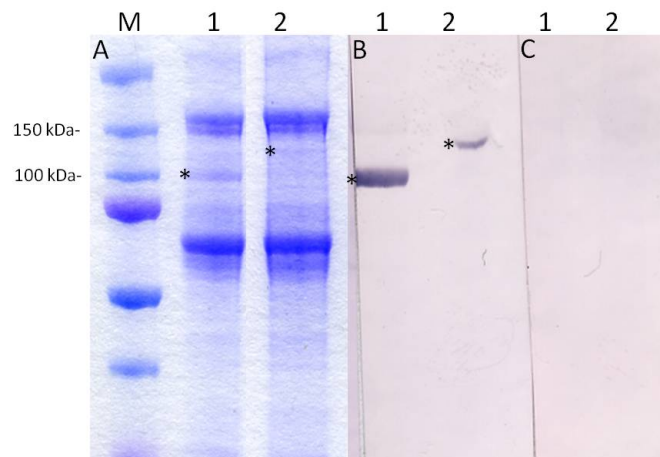
wurden für die Klonierung der Konstrukte mit alkalischer Phosphatase am C-terminalen Ende verwendet, die Enzyme XhoI und XbaI für Konstrukte mit alkalischer Phosphatase am N-terminalen Ende. In Tabelle 5.1 sind die für die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Klone aufgeführt. Diese enthalten alle ein fehlerfrei amplifiziertes und korrekt inseriertes cDNA-Insert und sind als Dauerkulturen für weitere Untersuchungen verfügbar. Die korrekte Orientierung der Inserts wurde durch Sequenzierung der Übergangsabschnitte zwischen CEACAM16-cDNA und Vektor überprüft.

**Tabelle 5.1: Bakterienklone mit korrekten Konstrukten, die für weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.**

Fusionsprotein	Bakterienklonnummer
pAPtag-5-mCC16-AP	Klon 1
pAPtag-5-mCC161A-AP	Klon 5
pAPtag-5-AP-mCC16BN2	Klon 4
pAPtag-5-hCC16-AP	Klon 3
pAPtag-5-hCC16N1A-AP	Klon 6

Mit den aufgereinigten Plasmiden wurden HEK293T-Zellen transient transfiziert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch den Nachweis der thermostabilen alkalischen Phosphatase in den Zellkulturüberständen überwacht (Abb. 4.3). Im Medium von Zellen, welche nicht mit einem dieser Konstrukte transfiziert wurden, waren nach thermischer Inaktivierung keine signifikanten Mengen von alkalischer Phosphatase nachweisbar.

Die Vektoren, welche für Fusionsproteine mit humanem CEACAM16 kodieren, wurden an unseren Kooperationspartner D.J. Hill weitergegeben. Dieser führte eine Aufreinigung der Proteine anhand des enthaltenen His-tag durch und untersuchte ob Bakterienarten, die CEACAMs als zelluläre Rezeptoren benutzen, in der Lage sind, auch an CEACAM16 zu binden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Fusionsproteine mittels Western Blot analysiert. Diese Ergebnisse wurden uns freundlicherweise überlassen und sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Die Fusionsproteine hatten eine molekulare Größe von ca. 100 kDa bzw. 140 kDa.

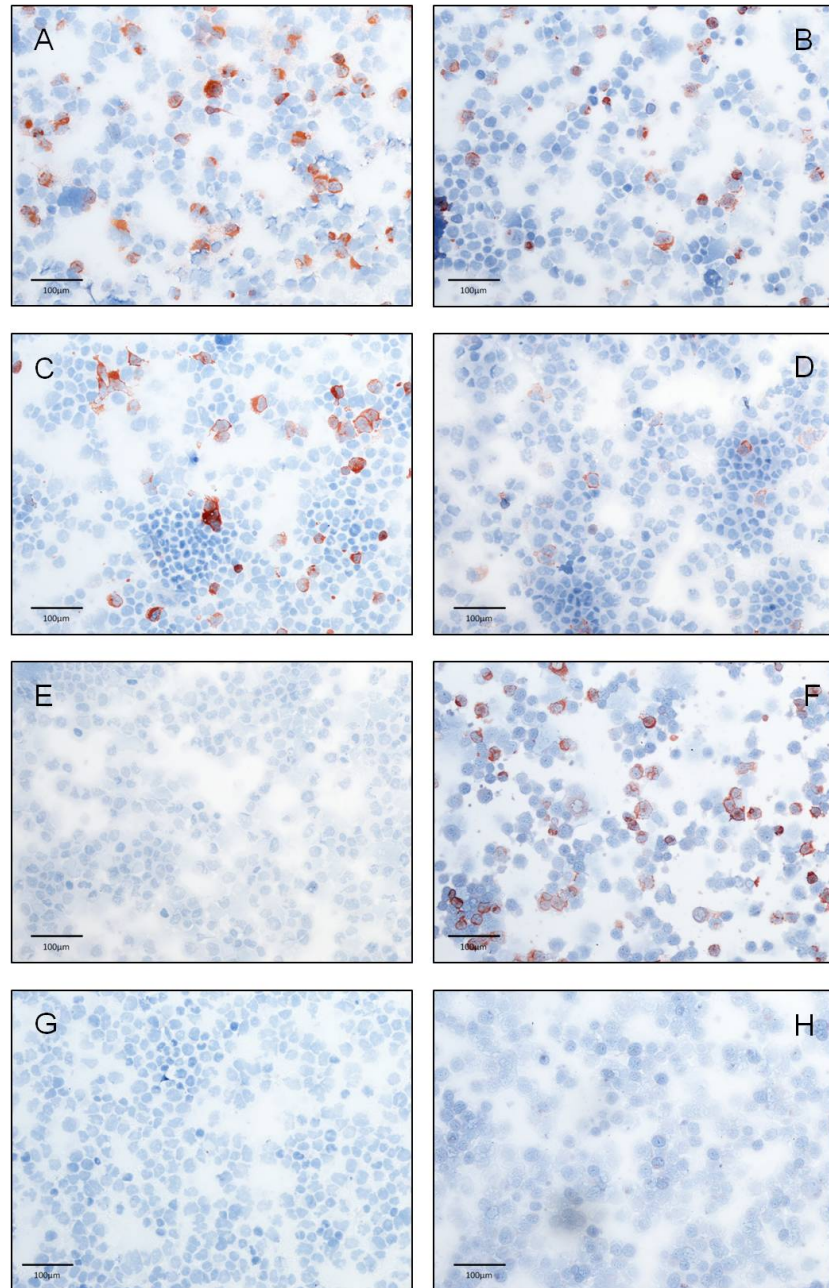


**Abbildung 5.7: Western Blot-Analyse der Fusionsproteine aus humanem CEACAM16 und humaner plazentarer alkalischer Phosphatase.** (A) Abbildung der aufgetrennten Proteine im Gel mit Coomassie-Färbung gefärbt; (B) Nach Detektion mit einem Anti-His-tag Antikörper zeigen sich Banden bei ca. 100 kDa was für das hCC16N1A-AP Fusionsprotein zu erwarten ist und bei ca. 140 kDa für das hCC16-AP Fusionsprotein. (C) Negativkontrolle durch Färbung mit dem Sekundärantikörper (anti-mouse-AP in einer Verdünnung von 1:30000 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien)) ohne vorherige Inkubation mit einem Detektionsantikörper. M=Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad); (1): hCC16N1A-AP Fusionsprotein; (2): hCC16-AP Fusionsprotein; (D.J. Hill, University of Bristol, Bristol, Großbritannien, unveröffentlicht)

### Immunzytologische Untersuchungen der Fusionskonstrukte

Um die Domäne von CEACAM16, in welcher das Zielepitop des monoklonale Antikörpers liegt, durch immunzytologische Untersuchungen genauer bestimmen zu können, wurden Cytospins transient transfizierter HEK293T-Zellen angefertigt. Diese Zellen exprimierten die unterschiedlichen Fusionsproteine aus murinem CEACAM16 und humaner plazentarer alkalischer Phosphatase. Durch parallele Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper 9D5, dem polyklonalen Immunsereum gegen murines CEACAM16 sowie einem Antikörper gegen das myc-Epitop der Fusionsproteine wurde untersucht, welche Domänen von dem Antikörper 9D5 detektiert werden. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass Konstrukte, in denen die N1- und A-Domänen oder das vollständige CEACAM16-Protein enthalten sind, vom Antikörper 9D5 erkannt wurden. Konstrukte, welche ausschließlich die N2- und B-Domäne enthalten, werden nicht detektiert (Abb. 5.8). Das Bindungsepitop des Antikörpers muss somit in der N-terminalen Hälfte des Proteins liegen. Die Ergebnisse wurden mittels Detektion mit einem gegen c-myc gerichteten Antikörper verifiziert. Das polyklonale Immunsereum erkennt die Konstrukte, welche nur die N1- und A-Domäne enthalten, wesentlich schwächer als solche mit der N2- und B-Domäne.





**Abbildung 5.8: Eingrenzung des Bindungsepitops durch immunzytologische Untersuchungen.** Transient transfizierte HEK293T-Zellen, welche die unterschiedlichen Fusionsproteine aus den oben beschriebenen Vektoren exprimieren (A, B: mCC16-aP; C, D: mCC16N1A aP; E, F aP mCC16BN2;) bzw. als Negativkontrolle humane placentare alkalische Phosphatase aus dem unveränderten pAPtag-5 Vektor (G, H), wurden mit dem monoklonalen Antikörper 9D5 in einer Verdünnung von 1:500 in PBS (A, C, E, G) und dem polyklonalen murinen Immunsereum gegen murines CEACAM16 in einer Verdünnung von 1:300 in PBS (B, D, E, H) immunzytologisch angefärbt. Der Antikörper 9D5 detektiert die Fusionsproteine nur dann, wenn die N-terminale Hälfte enthalten ist (keine Färbung in E, jedoch positive Färbung in F). Das Bindungsepitop des Antikörpers liegt also in diesem Bereich von CEACAM16. Das polyklonale Immunsereum erkennt auch die C-terminale Hälfte des CEACAM16.

### 5.2.2 Nachweis des CEACAM16-Proteins im murinen Innenohr

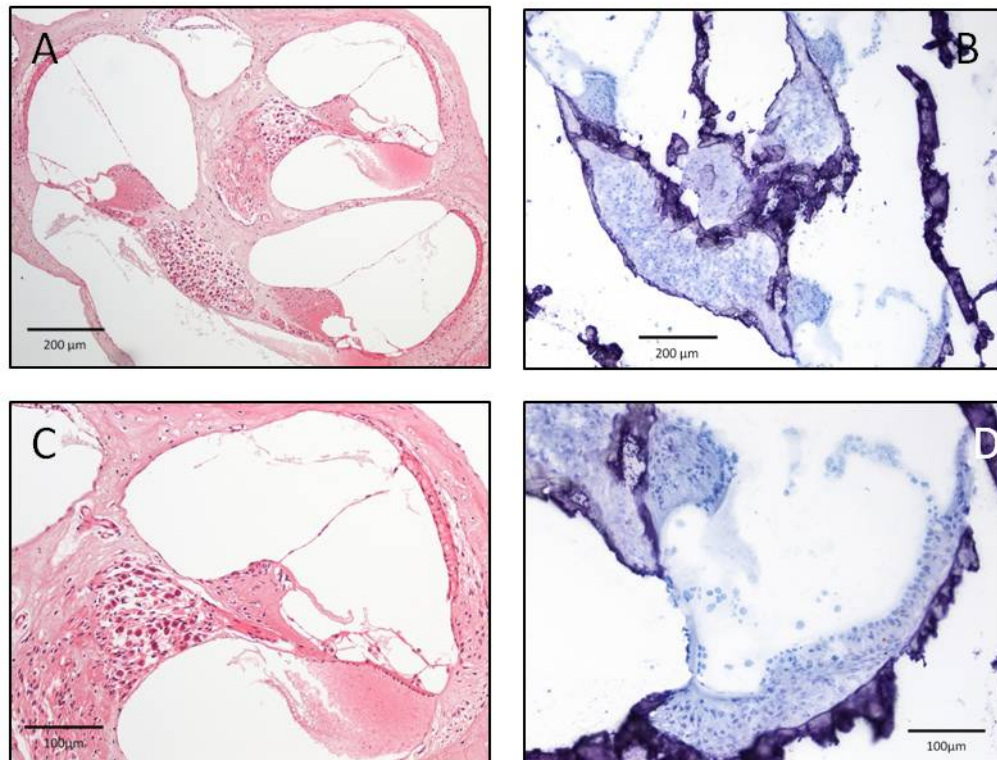
Nachdem die Spezifität des monoklonalen Anti-CEACAM16 Antikörpers überprüft worden ist, konnte dieser nun genutzt werden um die genaue Lokalisation von CEACAM16 im Gewebe zu bestimmen. Als Negativkontrolle für den Proteinnachweis konnten wir auf eine CEACAM16-defiziente Maus, die in unserem Labor entwickelt wurde zurückgreifen.

#### Herstellung und morphologische Untersuchung von histologischen Schnitten muriner Innenohren

Kryoschnitte eignen sich in der Regel aufgrund der guten Antigenerhaltung, sehr gut für die Immunhistologie. Beim Innenohr handelt es sich jedoch um eine sehr filigrane Struktur, die zudem noch von einem Knochen umgeben ist, der sich im nativen Zustand nur schlecht schneiden lässt. Abbildung 5.9 (B,D) zeigt, dass der Erhalt der Morphologie bei Kryoschnitten nur unzureichend war, sodass eine eindeutige Zuordnung der Strukturen oder einer immunhistologischen Anfärbung nicht immer sicher möglich war. Ein besserer Strukturergalt des geschnittenen Gewebes kann durch eine Fixierung und Einbettung in Paraffin erreicht werden. Insbesondere eröffnet dies die Möglichkeit das Gewebe zu dekalzifizieren, wodurch der knöcherne Anteil weicher und schneidfähiger wird. Es ist uns gelungen ein Protokoll zu etablieren, mit welchem zuverlässig reproduzierbar dekalzifizierte Paraffinschnitte mit gutem Struktur- und Antigenerhalt angefertigt werden können. In Abbildung 5.9 (A,C) ist zu erkennen, dass sich bei den Paraffinschnitten die anatomischen Strukturen, inklusive der membranösen Bestandteile bis auf Einzelzelebene eindeutig abgrenzen und identifizieren lassen. Die etablierte Methode ist im Kapitel 4.3.2 ausführlich beschrieben.

**Abbildung 5.9: Strukturergalt der histologischen Schnitte nach unterschiedlichen Fixierungsmethoden.** (A, C): Histologische Schnitte muriner Innenohren nach Paraffinfixierung und Entkalzifizierung mit EDTA-Zitronensäure. Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt in zehnfacher (A) und zwanzigfacher (C) Vergrößerung. (B, D): Murine Innenohren nach Gefrierfixierung und Färbung mit Hämatoxylin in zehnfacher (B) und zwanzigfacher (D) Vergrößerung. Trotz des Zersplitters des Knochens beim Anfertigen der Schnitte kryokonservierter Gewebe sind die feinen membranösen Strukturen des Innenohres noch zu erkennen, jedoch fällt eine genaue Identifikation und Zuordnung schwer. Der Strukturergalt nach Paraffinfixierung und Entkalzifizierung ist deutlich besser und lässt eine genaue Identifikation der Strukturen zu.





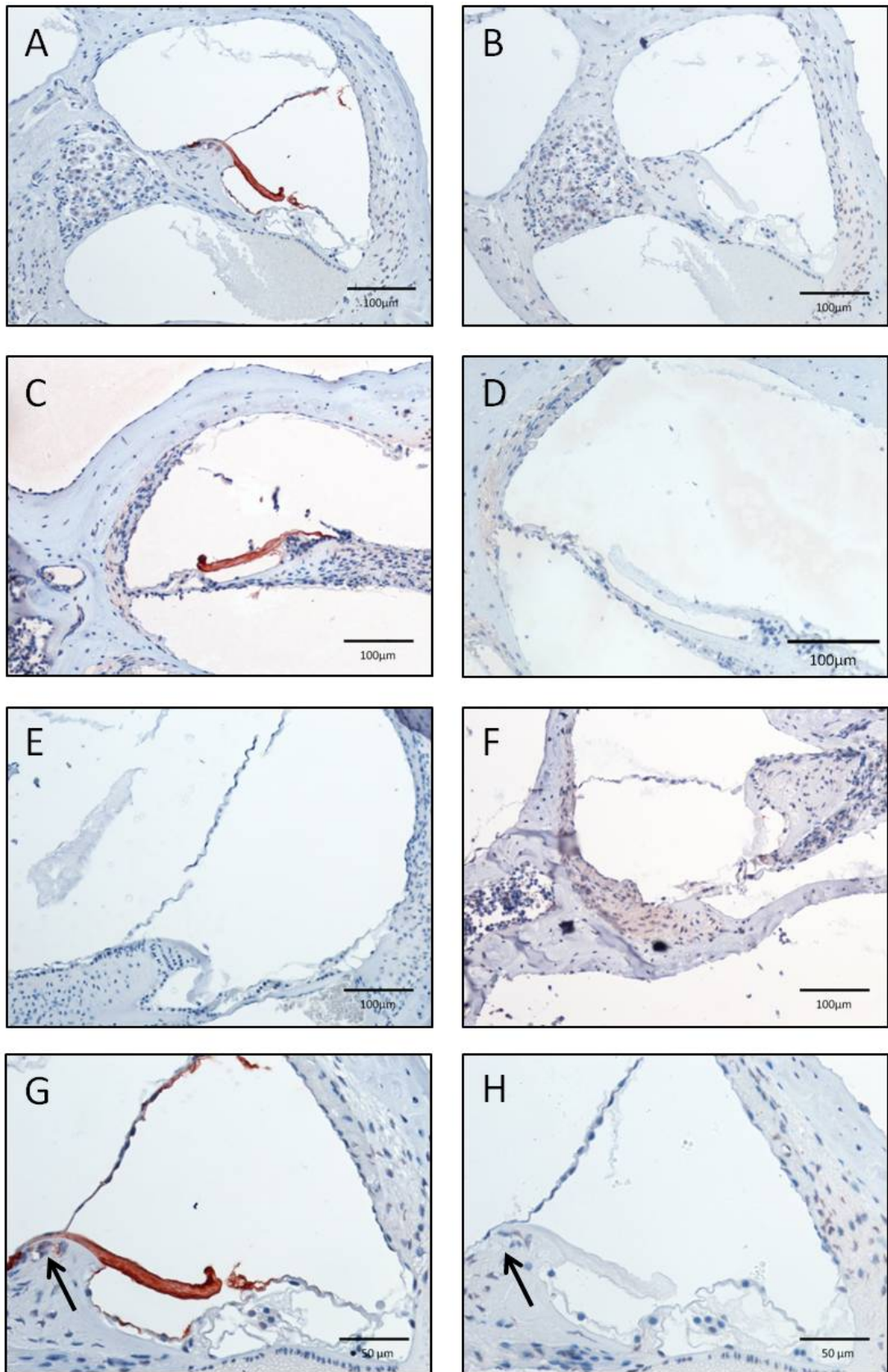
### Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten muriner Innenohrgewebe

Die immunhistochemischen Färbungen wurden sowohl mit dem polyklonal Immuns serum gegen murines CEACAM16 als auch mit dem monoklonalen Antikörper 9D5 gegen humanes CEACAM16 durchgeführt. Da wir in dieser Arbeit zeigen konnten, dass beide Antikörperpräparationen sowohl das murine als auch das humane CEACAM16 erkennen, konnten wir beide Antikörper verwenden, um murines Gewebe zu untersuchen. In beiden Fällen handelt es sich aber um murine Antikörper. Um dennoch die Anwendung auf Mausgeweben möglich zu machen, ohne durch unspezifische Bindungen eines Zweitantikörpers gegen murines IgG einen zu starken Färbungshintergrund zu erhalten, wurde der Antikörper 9D5 mit Biotin gekoppelt. Die Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurde mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Komplex durchgeführt. Bei Färbungen mit dem Immuns serum diente das Präimmuns serum als Negativkontrolle. Bei der Verwendung des biotinylierten Antikörpers 9D5 wurde als Negativkontrolle PBS an Stelle der Antikörperlösung auf die Gewebe aufgebracht. Zudem wurden Innenohrgewebeschnitte von CEACAM16-defizienten Mäusen als Negativkontrolle mitgeführt. Ergänzend führten wir vergleichende Untersuchungen mit Tieren durch, welche heterozygot für CEACAM16-Defizienz waren, das heißt eine intakte Kopie

des Genes aufwiesen, während die zweite Kopie deletiert wurde. Diese Tiere entstanden im Rahmen der Züchtung der CEACAM16-Nullmutanten und konnten daher für diese Untersuchungen herangezogen werden.

Durch die immunhistochemischen Färbungen konnte nachgewiesen werden, dass das CEACAM16-Protein der Maus in der Tektorialmembran lokalisiert ist. Hier zeigt sich die stärkste und am zuverlässigsten reproduzierbare Färbung. Darüber hinaus zeigt sich ein reproduzierbares Färbesignal im Bereich der Interdentalzellen des *Limbus spiralis* in Geweben von Wildtypmäusen und Mäusen, welche heterozygot für CEACAM16-Defizienz sind. Eine unspezifische Bindung ist durch das Fehlen einer Färbung dieser Zellen in den Geweben der CEACAM16-defizienten Mäusen weitestgehend ausgeschlossen. Die *Stria vascularis* zeigt zwar ebenfalls ein schwaches Signal, dieses ist jedoch in der Negativkontrolle vorhanden und muss daher am ehesten als unspezifisch angesehen werden. Mit dem Nachweis von CEACAM16 in der Tektorialmembran und den Interdentalzellen des *Limbus spiralis* ist es uns gelungen CEACAM16 auch auf Proteinebene im murinen Innenohr zu lokalisieren.

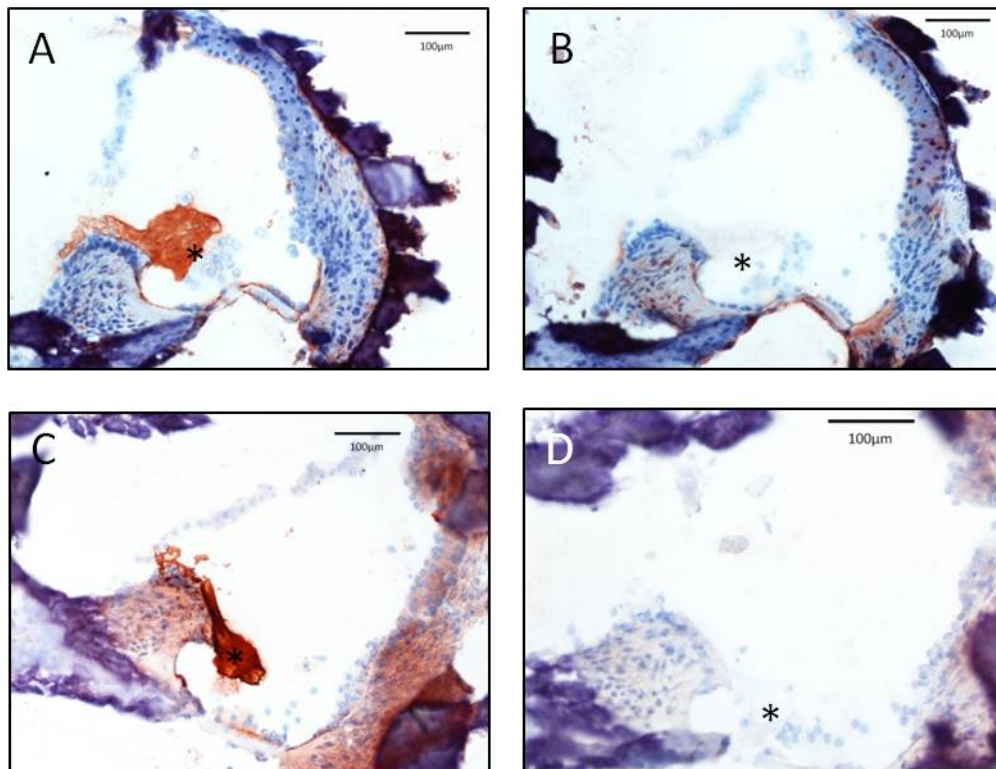
**Abbildung 5.10: Immunhistologische Färbungen muriner Innenohrgewebe mit dem Antikörper 9D5 nach Paraffinfixierung.** Innenohrgewebe einer Wildtypmaus (A, B), einer CEACAM16 heterozygoten Mutante (C, D) und einer CEACAM16-Nullmutante (E, F) nach immunhistochemischer Färbung mit dem Anti-CEACAM16 Antikörper 9D5 in einer Verdünnung von 1:500 (A, C, E, G) und als Negativkontrolle mit reinem PBS (B, D, F, H). Zur Antikörperdetektion diente in allen Fällen Streptavidin-HRP in einer Konzentration von  $0,002\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die Darstellungen A-F erfolgen in zwanzigfacher Vergrößerung, die Darstellungen G und H in vierzigfacher Vergrößerung. Es zeigt sich sowohl in den Wildtypgeweben als auch in denen der CEACAM16-heterozygoten Mutante ein positiver Nachweis für CEACAM16-Protein in der Tektorialmembran (A,C). In den Geweben der CEACAM16-Nullmutanten zeigt sich entsprechend keine Färbung dieser Struktur (E). Bei stärkerer Vergrößerung (G, H) zeigt sich eine Färbung im Bereich der Interdentalzellen des apikalen *Limbus spiralis* (Pfeil) bei Wildtypgeweben (G). Es wurde keine Färbung bei Geweben von Nullmutanten (E) oder der Negativkontrolle (H) beobachtet.



### Immunhistologische Färbung von kryokonservierten murinen Innenohrgewebe

Die durch die Färbung von Paraffinschnitten erhaltenen Ergebnisse wurden durch Färbungen von Schnitten gefrierkonservierter Gewebe verifiziert, da diese nicht chemisch fixiert werden und somit das weitestgehend native Protein vorliegt. Die immunhistologische Färbung erfolgte hierbei wieder mit dem polyklonalen Immuns serum und dem monoklonalen Antikörper 9D5. Bei der Verwendung des Immuns erums bzw. Präimmuns erums wurde zur Reduktion von unspezifischen Kreuzreaktionen das Mouse-to-Mouse IHC Detection System Kit angewendet. Der Vergleich zeigt in gefrierfixierten Schnitten ebenfalls eine Färbung der Tektorialmembran (Abb. 5.11). Die von uns durchgeführten Schritte zur Fixierung der Gewebe und Entkalkifizierung der knöchernen Anteile mit EDTA-Zitronensäure im Rahmen der Herstellung der Paraffinschnitte haben keinen entscheidenden Einfluss auf den Antigenerhalt. Aufgrund des stärkeren Färbehintergrundes und des schlechteren Strukturerhaltes kann eine Detektion von CEACAM16 in den Interdentalzellen nicht sicher beurteilt werden. Darüber hinaus konnte die Anwendbarkeit des Antikörpers 9D5 für die immunhistochemie mit gefrierkonservierten Geweben gezeigt werden, wobei er in deutlich niedrigerer Konzentration als bei der Anwendung auf Paraffinschnitten eingesetzt werden kann.

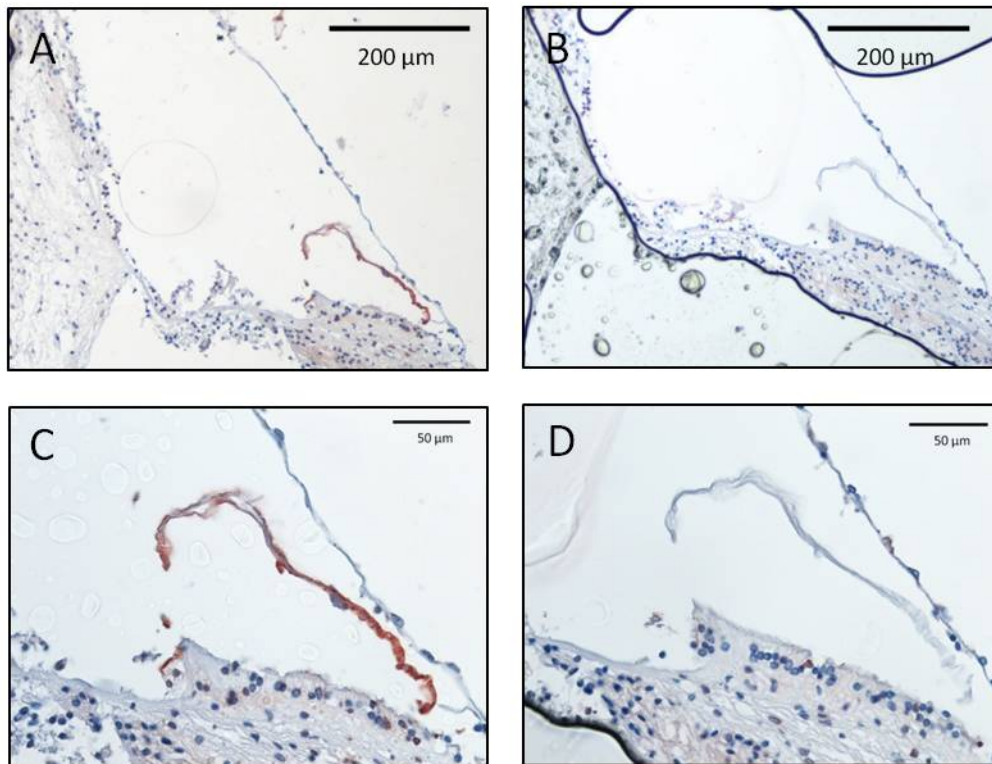
**Abbildung 5.11: Immunhistologische Färbung von Schnitten gefrierkonservierter muriner Innenohrgewebe.** Histologische Schnitte gefrierkonservierter muriner Innenohrgewebe von Wildtypmäusen wurden mit polyklonalem murinem Immuns erum gegen murines CEACAM16 in einer Verdünnung mit PBS 1:200 (A) und dem biotinylierten Antikörper 9D5 in einer Verdünnung von 1:500 (D) immunhistologisch gefärbt. Als Negativkontrolle diente dabei das murine Präimmuns erum 1:200 in PBS verdünnt (B) sowie PBS ohne Primärantikörper (D). Zur Antikörperdetektion wurde an Streptavidin gebundene HRP in einer Konzentration von  $0,002\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in PBS mit 0,1% BSA verwendet. In beiden Fällen zeigt sich eine deutliche Anfärbung der Tektorialmembran (durch \* markiert), wobei eine Färbung der Interdentalzellen aufgrund des stärkeren Färbehintergrundes nicht sicher beurteilbar ist. (Alle Darstellungen in zwanzigfacher Vergrößerung.)



### 5.2.3 Nachweis des CEACAM16-Proteins im humanen Innenohr

Durch unsere Kooperationspartner Dr. Diethilde Theil, Labor für Experimentelle Neurologie der LMU München, wurden uns Paraffinschnitte humaner Innenohren zur Verfügung gestellt. Diese wurden mit dem biotinylierten Anti-CEACAM16 Antikörper 9D5 nach gleichem Protokoll wie murine Paraffinschnitte angefärbt. Auch hier diente PBS anstelle des Primärantikörpers als Negativkontrolle. Wie in Abbildung 5.12 zu erkennen, erwies sich der Strukturerhalt der vorhandenen Schnitte leider als nicht optimal. Eine eindeutige Zuordnung der Strukturen ist nur teilweise möglich, jedoch können beim Vergleich der Färbung mit der Negativkontrolle gefärbte Strukturen identifiziert werden, welche von der Lokalisation und Morphologie der Tektorialmembran zuzuordnen sind. Positive zelluläre Strukturen wie die Interdentalzellen oder die *Stria vascularis* ließen sich an diesen Schnitten nicht nachweisen.





**Abbildung 5.12: Immunhistologische Färbung humaner paraffineingebetteter Innenohrgewebe.** Als Primärantikörper wurde der monoklonale Antikörper 9D5 gegen humanes CEACAM16 in einer Verdünnung von 1:500 in PBS eingesetzt (A,C). Als Negativkontrolle diente reiner PBS (B,D). Anstelle eines Sekundärantikörpers wurde an Streptavidin gebundene HRP in einer Konzentration von  $0,002\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in PBS mit 0,1% BSA eingesetzt. Es zeigt sich eine CEACAM16-positive Struktur, welche als Tektorialmembran identifiziert werden kann. (Darstellungen in zehnfacher (A,B) bzw. vierzigfacher (C,D) Vergrößerung)

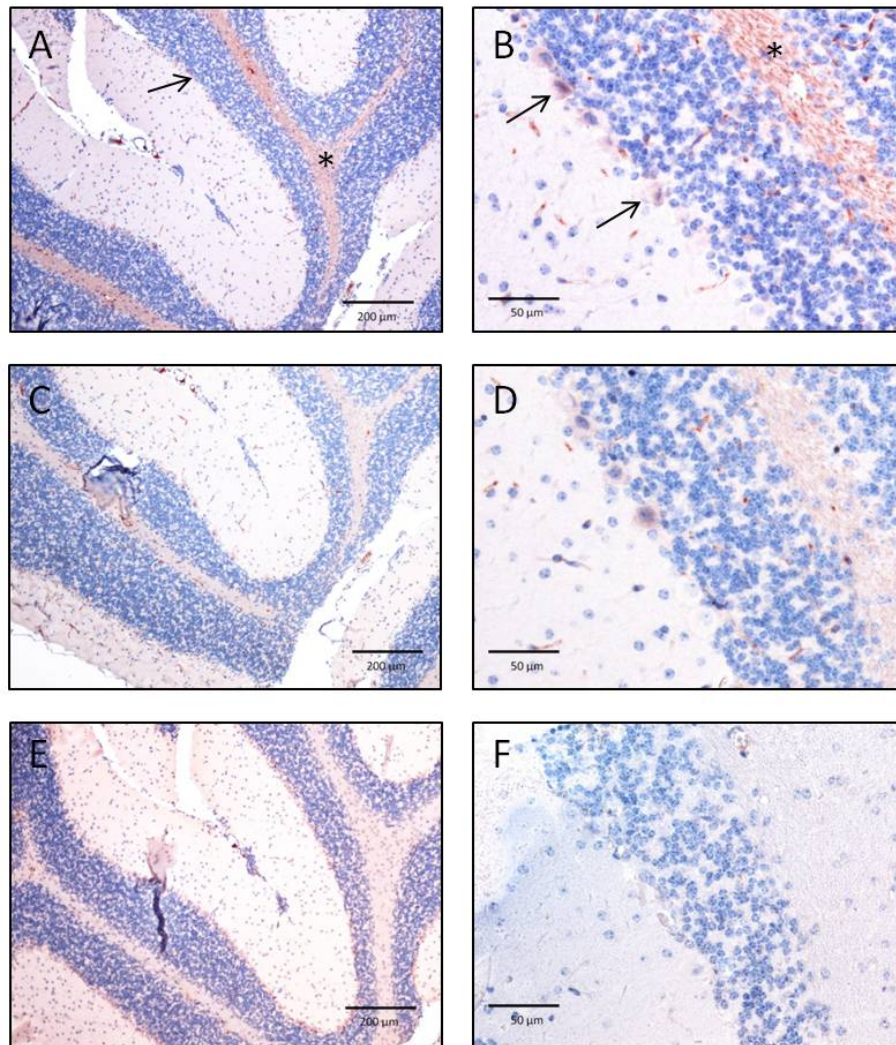
#### 5.2.4 Untersuchung des CEACAM16-Proteins im murinen Kleinhirn

Aufgrund der Hinweise durch RT-PCR-Analysen, dass CEACAM16 im murinen Kleinhirn exprimiert wird, wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden Paraffinschnitte muriner Kleinhirne mit dem gegen murines CEACAM16 gerichteten polyklonalen Immuns serum immunhistologisch gefärbt. Es wurde in diesem Fall, analog zur Färbung der kryokonservierten murinen Innenohrgewebe, das Mouse-to-Mouse IHC Detection System Kit verwendet. Eine Anwendung des biotinylierten Antikörpers 9D5 zeigte bei ersten, orientierenden Färbungen einen sehr starken Hintergrund, weshalb dieser nicht weiter verwendet wurde. Es wurden zunächst Gewebe von Wildtyp-Mäusen angefärbt. Als Negativkontrolle diente zum einen Präimmuns serum und zum anderen ein Immuns serum gegen ein Antigen (CEACAM20), für welches keine Expression im Klein-

hirn beschrieben ist. Durch die Verwendung der zusätzlichen Negativkontrolle sollte eine unspezifische Färbung durch endogene Antikörper im Immunserum ausgeschlossen werden. Bei der Färbung der Gewebe zeigt sich ein positives Signal im Bereich der Marklagerschicht und ein schwacher Nachweis im Bereich der Purkinjezellen des Kleinhirns bei Verwendung des Anti-CEACAM16 Immunserums (Abb. 5.13). Die Färbung im Bereich des Marklagers zeigt bei stärkerer Vergrößerung einen streifigen Charakter, der auf eine Färbung von Faserstrukturen hinweist (Abb. 5.13 B). Bei der Färbung mit Präimmunserum und bei Verwendung des Immunserums gegen ein irrelevantes Antigen färben sich diese Strukturen nicht an. Dagegen zeigen die Gefäßanschnitte auch in der Negativkontrolle eine Färbung, was durch die endogene Peroxidase der Erythrozyten hervorgerufen werden könnte.

Hinsichtlich der Spezifität dieses ersten immunhistologischen Nachweises von CEACAM16 im Marklager und den Purkinjezellen des Kleinhirns müssen weitere Untersuchungen z.B. mit Hilfe der CEACAM16-Nullmutanten oder nicht-biotinyliertem Antikörper 9D5 erfolgen.

Da eine mit dem Marklager vergleichbare Schicht im Großhirn existiert wurden Parafinschnitte muriner Großhirne nach gleicher Methode angefärbt (Ergebnisse nicht abgebildet). Es ließen sich im Rahmen dieser Untersuchungen keine Hinweise auf eine Lokalisation von CEACAM16 im murinen Großhirn finden.



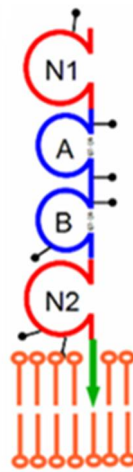
**Abbildung 5.13: Immunhistologische Färbung paraffineingebetter muriner Kleinhirngewebe.** Die Färbung erfolgte mit einem murinen polyklonalen Anti-CEACAM16 Immunsersum unter Verwendung des Mouse-to-mouse IHC Detection Kits. Als Negativkontrolle dienten das Präimmunsersum und ein Immunsersum gegen ein im Kleinhirn nicht exprimiertes Antigen (CEACAM20). (A, B) polyklonales Immunsersum gegen murines CEACAM16 in einer Verdünnung von 1:300 in PBS. (C, D) polyklonales Präimmunsersum in einer Verdünnung von 1:200 in PBS. (E, F) polyklonales Immunsersum gegen murines CEACAM20 in einer Verdünnung von 1:200 in PBS (A, C, E) in zehnfach Vergrößerung (B, D, F) in zwanzigfacher Vergrößerung. Es zeigt sich ein Signal im Bereich des Marklagers mit streifigem Charakter (\*) und ein schwacher Nachweis im Bereich der Purkinjezellen des Kleinhirnes (Pfeil) bei der Verwendung des polyklonalen Anti-CEACAM16 Serums. Weder bei der Verwendung des Präimmunsersums noch eines Serums gegen ein irrelevantes Antigen zeigt sich eine vergleichbare Färbung.

### 5.3 Zelladhäsionsmodell zum Nachweis des homophilen Interaktionspotentials von CEACAM16

Der Nachweis von CEACAM16 in der azellulären Tektorialmembran und den Interden-talzellen unterstützt die bereits zuvor genannten Gründe, welche zur Annahme geführt



haben, dass es sich bei CEACAM16 um ein sezerniertes Protein handelt. Neben der Protein-Protein-Wechselwirkung ist die Fähigkeit zur homologen Bindung und damit zur Di- und Oligomerisierung eine häufige Eigenschaft solcher Proteine, weshalb CEACAM16 auf sein Potential zur homophilen Interaktion untersucht werden sollte. Hierzu wurde ein Zelladhäsionsmodell entwickelt, bei dem Zellen artifiziell Fusionsproteine aus CEACAM16 und dem GPI-Anker der humanen, plazentaren alkalischen Phosphatase an der Oberfläche tragen. Eine schematische Darstellung eines Konstruktes mit Verankerung in der Membran zeigt Abbildung 5.14.



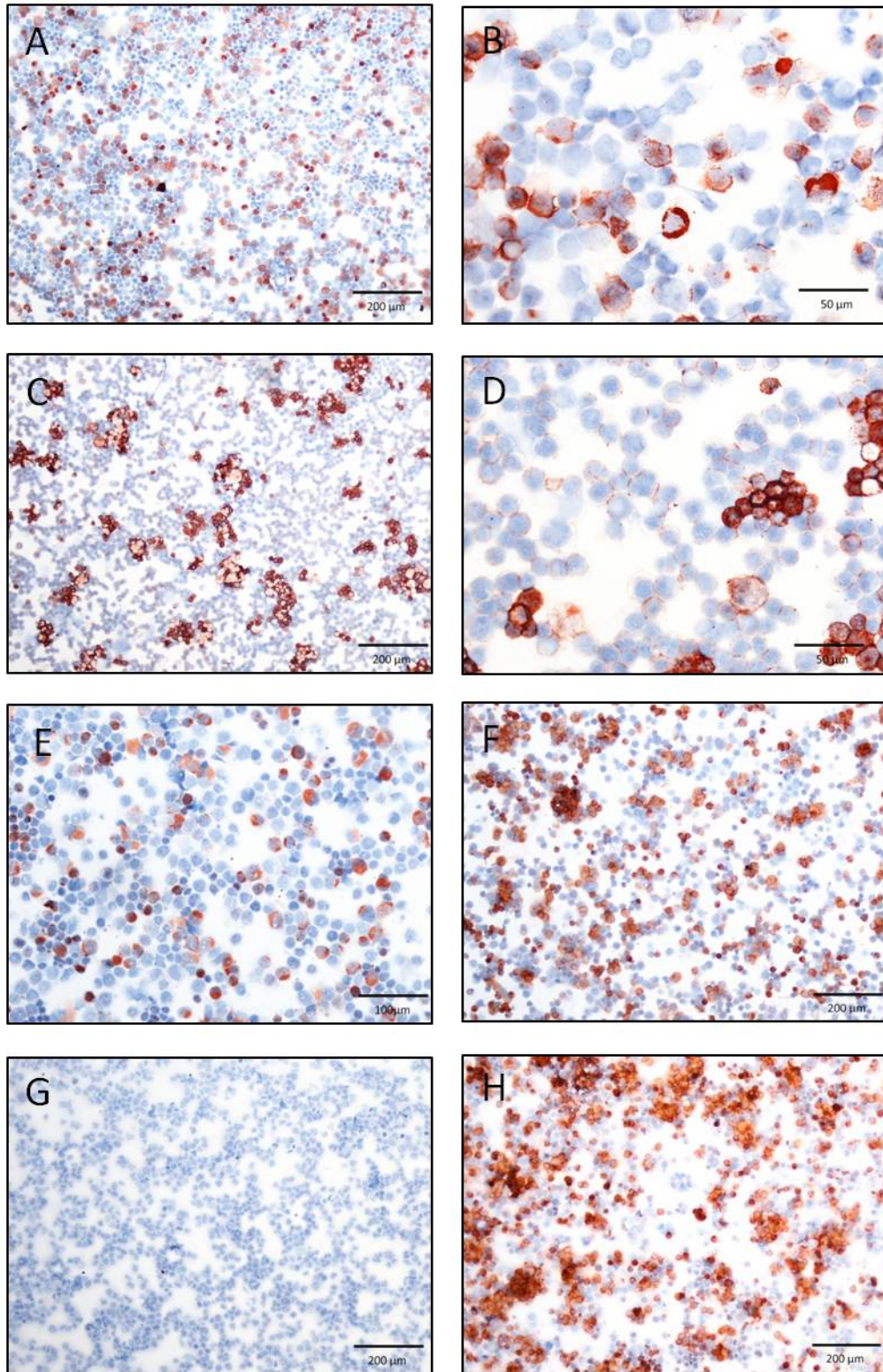
**Abbildung 5.14: Schematische Darstellung des murinen CEACAM16-Proteins mit artifiziellem GPI-Anker zur gebundenen Expression an der Zelloberfläche.** Schematische Darstellung des CEACAM16-Proteins mit seinen vier Untereinheiten. An die N2-Untereinheit wurde artifizuell ein GPI-Anker (grüner Pfeil) gebunden, um anstelle der Sezernierung eine Membranbindung an der Außenseite der Zelloberfläche zu erreichen, ohne dabei die Interaktionsfähigkeit der einzelnen Domänen entscheidend einzuschränken.

Die CEACAM16-Proteine werden so membrangebunden für eine Interaktion angeboten. Im Falle einer homophilen Wechselwirkung lagern sich CEACAM16-GPI positive Zellen in einer Zellsuspension zu Zellverbänden zusammen. Die transient transfizierten Zellen wurden zunächst aus der Kultur geerntet und durch Resuspension unter sorgfältigem Mischen vereinzelt. Im Anschluss fand eine Inkubation bei Raumtemperatur statt, um den positiven Zellen die Möglichkeit zu geben, sich zusammenzulagern. Nach Anfertigung von Cytospins dieser Zellsuspensionen erfolgte deren immunzytologische Anfärbung mit dem monoklonalen Antikörper 9D5. Es konnte beobachtet werden, dass sich Zellen, welche CEACAM16-GPI-Fusionsproteine an der Oberfläche exprimieren, vermehrt zu

Zellgruppen zusammenfinden (Abb. 5.15). Zellen, die natives CEACAM16 exprimieren, erscheinen nach identischer Vorbehandlung in den Cytospins als braun angefärbte Zellen, sind aber als Einzelzellen verteilt und nicht zu Zellaggregaten zusammengelagert. CEACAM16 ist demnach zu homophilen Bindung und damit zur Bildung von Di- oder Multimeren fähig.

Die Bildung von Zellaggregaten konnten wir sowohl bei Zellen mit humanem CEACAM16 als auch bei solchen mit murinem CEACAM16 an der Zelloberfläche beobachten, wobei sich der Effekt beim murinen Protein wesentlich stärker darstellt (Abb. 5.15 C im Vergleich zu F). Bei Zellen, welche Fusionsproteine mit humanem CEACAM16 auf ihrer Oberfläche tragen, zeigen sich weiterhin Einzelzellen zwischen den Zellansammlungen. Dies lässt sich bei den CEACAM16-GPI positiven Zellen mit murinem CEACAM16 kaum beobachten. Dass es sich bei der Beobachtung um einen Effekt handelt, welcher durch die Transfektion der Zellen oder die Zellart an sich zustande kommt, ist unwahrscheinlich, da in gleichartig behandelten Zellen, welche das native CEACAM16 exprimieren, kein derartiges Phänomen beobachtet werden kann. Um auszuschließen, dass es sich bei der Beobachtung um ein Artefakt handelt, wurde eine weitere Versuchsreihe mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten angefertigt. Hierbei ließen sich nur geringe Unterschiede zwischen einer kurzen Inkubation und Stehzeiten von bis zu einer Stunde beobachten (Abb. 5.15 F im Vergleich zu H). Dies ließe sich durch eine starke Bindungsaffinität von CEACAM16 zu sich selbst erklären. Darüber hinaus setzten wir die Zellsuspensionen nach Aggregation mechanischem Stress aus, was nicht zum Vereinzeln der zusammengelagerten Zellen führte. Auch dies spricht für eine hohe Stabilität der homologen Bindung und eine starke Affinität von CEACAM16 zu sich selbst.

**Abbildung 5.15: Immunzytologische Untersuchungen von CEACAM16-GPI positiven HEK293T-Zellen.** Transient transfizierte HEK293T-Zellen, welche entweder natives murines (A, B) oder humanes (E) CEACAM16-Protein exprimieren oder an ihrer Oberfläche Fusionsproteine aus murinem (C, D) oder humanem (F, H) CEACAM16 und einem GPI-Anker tragen, wurden mit Hilfe des Anti-CEACAM16 Antikörpers 9D5 immunzytologisch gefärbt. Dabei zeigt sich, dass sich die CEACAM16-GPI positiven Zellen zu Zellhaufen zusammen finden (C, D). Dieses Ansammeln scheint sehr schnell zu erfolgen, da zwischen einer sehr kurzen Stehzeit (F) und einer Ruhephase von einer Stunde (H) nur ein geringer Unterschied besteht. Der Effekt ist bei Zellen, die das Fusionskonstrukt mit murinem CEACAM16 tragen, stärker als bei solchen, welche die Variante mit dem humanen Protein exprimieren. (G) zeigt eine Negativkontrolle, welche nach dem gleichen Prinzip behandelt wurde, jedoch exprimieren die Zellen ein irrelevantes Protein.



# 6 Diskussion

## 6.1 Proteininteraktionen von CEACAM16

Wir gingen davon aus, dass es sich bei CEACAM16 um ein sezerniertes Protein handelt, welche häufig Protein-Protein Wechselwirkungen eingehen. Um mögliche Interaktionen zwischen CEACAM16 und anderen Mitgliedern der CEACAM-Familie genauer zu beleuchten, untersuchten wir deren Expression im murinen Innenohr auf mRNA-Ebene. Es gelang uns die Expression von CEACAM1, CEACAM10, CEACAM14, CEACAM17 und CEACAM20 im Innenohr nachzuweisen. Diese stünden demnach als mögliche Partner zur Verfügung. Nur für CEACAM1 und CEACAM20, nicht jedoch für CEACAM10, CEACAM14 und CEACAM17, ist die Existenz eines orthologen Genes im menschlichen Genom nachgewiesen (Zimmermann, 2015). Da CEACAM16 sowohl im humanen als auch im murinen Innenohr exprimiert wird, ist eine Interaktion mit einem Protein, welches in beiden Spezies existiert wahrscheinlicher. Da zur Expressionsanalyse mittels RT-PCR die mRNA der kompletten Cochlea verwendet wurde und nicht speziell die einzelner Innenohrkompartimente wie dem Corti-Organ, kann noch keine Aussage über die genaue Lokalisation der einzelnen Mitglieder getroffen werden. So kann eine Expression im Knochen oder im Perilymphkompartiment aufgrund dieser Daten nicht von einer Lokalisation im Endolymphkompartiment und damit in räumlicher Nähe zu CEACAM16 unterschieden werden. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisation des CEACAM16-Proteins bestätigte sich die Annahme einer Bindung an die Tektorialmembran. Inwieweit hierbei auch die mit CEACAM16 koexprimierten Mitglieder der CEACAM-Familie eine Rolle spielen, bleibt bisher noch offen, jedoch sollte beachtet werden, dass es sich bei der Tektorialmembran um eine azelluläre Struktur handelt, wobei die koexprimierten CEACAM-Proteine zellmembranständig sind. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation der anderen Mitglieder im Innenohr sind notwendig, um deren Bedeutung genauer einschätzen zu können. Dass CEACAM16 grundsätzlich zur heterologen Interaktion fähig ist, konnten Zheng et al. durch den Nachweis einer Bindung an  $\alpha$ -Tectorin, welches eine wichtige Rolle in den Tektorialmembranarchitektur spielt und dessen Funktionsverlust zu Hörstörungen führt, zeigen (Zheng et al., 2011).

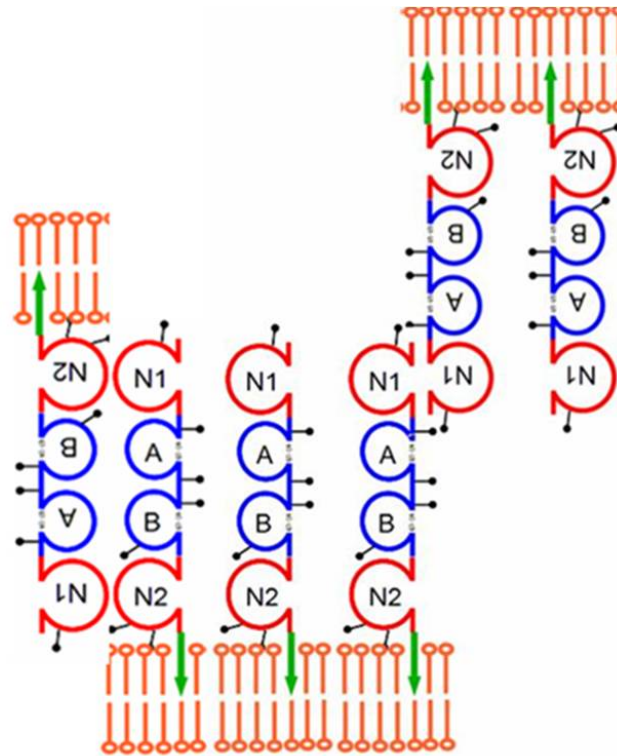
Neben heterologen Bindungen zeigen CEACAM-Proteine häufig homophile Interaktionen, was zur Bildung von Di- oder Multimeren führen kann (Horst und Wagener, 2004; Klaile et al., 2005, 2009). Um CEACAM16 hinsichtlich dieser Eigenschaft zu untersuchen, etablierten wir ein Zelladhäsionsmodell, bei dem Zellen über einen artifiziellen GPI-Anker gebundenes CEACAM16 an ihrer Zelloberfläche tragen. Es zeigte sich, dass diese in einer Einzelzellsuspension Zellaggregate formen, was wir auf eine homologe Bindung der CEACAM16-Proteine zurückführen. Folglich gehen wir davon aus, dass CEACAM16 zur Bildung von Dimeren oder Multimeren fähig ist. Wir konnten dies sowohl für humanes als auch für murines CEACAM16 zeigen, wobei sich der Effekt für das murine Protein stärker darstellt. Die Affinität von CEACAM16 zu sich selbst scheint sehr hoch zu sein. Bereits nach kürzester Zeit zeigte sich eine Aggregation der CEACAM16-GPI positiven Zellen, wobei diese auch mechanischem Stress stand hielt.

Die homologen Bindungen der CEACAM-Proteine können sowohl zwischen IgC- als auch IgV-ähnlichen Domänen erfolgen. So binden zwei CEACAM5-Proteine auf gegenüberliegenden Zellen antiparallel über die zellmembrannahe IgC-Domäne des einen und die apikale IgV-Domäne des anderen aneinander (Zhou et al., 1993). Die homologe Interaktion von CEACAM1 erfolgt über eine reziproke Bindung der N-terminalen IgV-Domänen zweier Proteine (Wikström et al., 1996). Für eine Bindung von zwei CEACAM16-Proteinen wäre es möglich, dass einzelne Domänen des Proteins aneinander binden oder das Protein auf ganzer Länge parallel oder antiparallel miteinander wechselwirkt. In Abbildung 6.1 sind beispielhaft zwei Möglichkeiten der Interaktion im Rahmen des Zelladhäsionsmodells dargestellt.

Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen konnten weiterführende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass bei CEACAM16, welches nativ nicht zellmembrangebunden, sondern frei sezerniert vorliegt, am ehesten die IgV-ähnliche N2-Domäne für die homologe Interaktion in Form der Bildung von Di- und Multimeren verantwortlich ist. Dabei wurden sowohl parallele als auch antiparallele Bindungskonfigurationen beobachtet. Aufgrund der aktuell vorliegenden Daten gehen wir davon aus, dass es sich um eine Interaktion über die Bildung von Disulfidbrücken handelt (Kammerer et al., 2012). Durch eine weitere Gruppe wurde die Bildung von Di- und Tetrameren durch das sezernierte Protein beschrieben (Zheng et al., 2011). Beachtet



man, dass die C-terminal gelegene N2-Domäne die stärkste Konservierung aufweist, ist es vorstellbar, dass die homologe Interaktion und die Bildung von höheren Strukturen eine wichtige funktionelle Rolle spielt.



**Abbildung 6.1:** Schematische Darstellung möglicher homophiler Interaktion von CEACAM16-Proteinen. Beispielhaft sind die vollständige antiparallele und die solitäre Bindung über die N1-Domäne dargestellt. Ebenso wären noch weitere Bindungsmöglichkeiten, z.B. die parallele oder antiparallele Bindung zweier unterschiedlicher Domänen aneinander, denkbar.

## 6.2 Expression von CEACAM16 im zentralen Nervensystem

In den Voruntersuchungen wurde die mRNA von CEACAM16 nicht nur im Innenohr sondern auch im Kleinhirn nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es ebenfalls CEACAM16 auf RNA-Ebene im Kleinhirn nachzuweisen. Aufgrund der EST-Datenbank-Analysen gab es darüber hinaus Hinweise auf eine Expression im Großhirn, was wir jedoch nicht bestätigen konnten. Dies lässt sich durch eine Expression von CEACAM16 in der Hypophyse erklären, welche bei der Verwendung von Proben aus vollständigen Gehirnen nur einen winzigen Anteil ausmacht, wodurch der Nachweis deutlich erschwert ist (Zebhauser et al., 2005; Krupar, 2012).

Durch immunhistologische Untersuchungen an Wildtypgeweben mit einem polyklonalen Immuns serum gegen murines CEACAM16 kann eine Lokalisation im Marklager des Kleinhirns vermutet werden. Auf Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper 9D5 wurden aufgrund der Biotinylierung und des hohen Biotingehaltes von Hirngewebe und des dadurch entstehenden starken Hintergrundfärbungen verzichtet. Das Kleinhirn ist aus einer Kleinhirnrinde, den Kleinhirnkernen und dem Marklager aufgebaut. Die Kleinhirnrinde besteht aus drei Schichten mit jeweils charakteristischen Zelltypen. Das Stratum moleculare mit Stern- und Korbzellen bildet die äußere Schicht. Die mittlere Schicht wird durch die Purkinjezellen gebildet und die innerste Schicht, das Stratum granulosum, enthält die Körnerzellen. Die Kleinhirnkerne sind "Neuroneninseln" innerhalb des Marklagers und bilden den Ausgangspunkt der langen absteigenden Nervenbahnen aus dem Kleinhirn. Das Marklager enthält die weiße Substanz, welche aus myelinisierten Nervenfasern besteht und keine Neurone enthält. Hier verlaufen Moosfasern mit Ursprung in unterschiedlichen Bereichen des zentralen Nervensystems, Kletterfaser aus dem Hirnstamm zur Kleinhirnrinde und die Axone der Purkinjezellen aus der Kleinhirnrinde zu den Kleinhirnkernen (Lüllmann-Rauch, 2003). Die Nervenzellfasern sind von Myelinscheiden umgeben. Neben den Axonen findet man extrazelluläre Matrix in der weißen Substanz. Sie enthält Hyaluronsäuren, Proteoglykane und Chondroitinsulfate (Ripellino et al., 1988). Ob CEACAM16 innerhalb der Axone der Purkinjezellen, der Myelinisierungsschicht der Nervenfasern, den Moosfasern, den Kletterfasern oder in der extrazellulären Matrix lokalisiert ist, kann aktuell noch nicht gesagt werden. Betrachtet man die Präparate bei stärkerer Vergrößerung fällt ein eher streifiges Färbungsmuster auf, welches sich in die Körnerschicht fortzusetzen scheint. Dies spricht für eine faserassoziierte Lokalisation. Bezieht man die Tatsache mit ein, dass kein Nachweis für CEACAM16-Expression im Großhirn erfolgen konnte (Zebhauser et al., 2005), kommen vor allem Strukturen in Betracht, welche zwar im Kleinhirn vorhanden sind, jedoch nicht im Großhirn. Die Axone der kleinhirnspezifischen Purkinjefasern verlaufen von den Zellen in der Rinde durch das Marklager und Enden an den Neuronen der Kleinhirnkerne und erreichen somit nicht das Großhirn (Lippert und Deller, 2003). Für eine Lokalisation in den Purkinjellaxonen spricht auch die Tatsache, dass man eine ähnlich schwache Färbung, wie sie in den Interdentalzellen des Innenohres zu beobachten ist, auch innerhalb der Purkinjezellen

beobachten kann. Wir konnten also starke Hinweise auf eine Lokalisation von CEACAM16 in den Purkinjezellen des Kleinhirns und ihrer Axone finden. Hier sollten weitere Untersuchungen zur Lokalisation von CEACAM16 und seiner Funktion im zentralen Nervensystem folgen. Weder bei der von CEACAM16-vermitteltem NSHL betroffenen Familie noch bei den von unserer Arbeitsgruppe untersuchten murinen CEACAM16-Nullmutanten wurde bisher eine Störung der Kleinhirnfunktion beobachtet. Die Analyse der Nullmutanten auf einen Kleinhirndefekt wäre im weiteren Verlauf sinnvoll.

## **6.3 Anfertigung von Gewebeschnitten muriner Innenohren**

Um immunhistologische Untersuchungen an murinen Innenohrgeweben sowohl bei Wildtypmäusen als auch bei CEACAM16-Nullmutanten durchführen zu können und dabei eine eindeutige Identifikation des komplexen anatomischen Aufbaus des Innenohres möglich zu machen, war es notwendig, Gewebeschnitte mit einem sehr guten Struktur- und einem ebenso guten Antigenerhalt bei den durchgeführten Untersuchungen zu verwenden. Gefrierschnitte zeigen meist einen sehr guten Antigenerhalt, da keine Denaturierung der Proteine durch Formalinfixierung erfolgt, jedoch stellte sich die Verwendung gefrierkonservierter Gewebe bei histologischen Untersuchungen des Innenohrs als eher ungünstig heraus, da die harten Knochenstrukturen beim Schneiden zersplittern und somit die zarten Membranstrukturen im Inneren zerstört werden. Dieses Problem konnten wir bei der Verwendung von Paraffinschnitten umgehen, indem wir eine Methode etablierten bei der die Innenohrgewebe nach Fixierung in Formaldehyd mit Hilfe von EDTA-Zitronensäure entkalkifiziert werden. In unseren Untersuchungen zeigten derart hergestellte Schnitte einen sehr guten Strukturhalt. Auf den Antigenerhalt hat diese keinen negativen Einfluss. Um jedoch Doppelfärbungen zur Lokalisation und Identifikation möglicher Interaktionspartner von CEACAM16 durchführen zu können ist, es unter Umständen notwendig gefrierkonservierte Gewebe zu nutzen. Eine Möglichkeit, eine Verbesserung hinsichtlich des Strukturhaltes zu erreichen bestünde darin, die Gewebe vor einer Gefrierkonservierung wie bei der Herstellung von Paraffinschnitten zu entkalkifizieren. Jedoch würden die Gewebe bei diesem Vorgehen unkonserviert bei Raumtemperatur in der Zitronensäurelösung ver-



bleiben. Der Antigenerhalt müsste unter diesen Bedingungen neu betrachtet werden. Da es sich beim Innenohr um eine sehr kleine Struktur handelt sind nur Inkubationszeiten von ca. zwölf Stunden zur Entkalkifizierung notwendig, sodass ein solches Vorgehen möglich erscheint. Eine weitere Möglichkeit ist es, als Reaktion auf die Härte der Knochenstruktur bei ausgewachsenen Mäusen, auf Gewebe jüngerer Tiere (z.B. 10 Tage) zurückzugreifen. In diesem Alter ist das Innenohr noch nicht so stark verknöchert und somit für die Anfertigung von Gefrierschnitten besser geeignet. Jedoch gelang in diesen Schnitten keine Anfärbung CEACAM16 positiver Strukturen. Somit ist auch die Verwendung jüngerer Tiere zur Herstellung von Gefrierschnitten in unserem Falle nicht geeignet. Es muss also aktuell weiterhin auf die nach unserer Methode hergestellten Paraffinschnitte oder Gefrierschnitte mit eingeschränktem Strukturerhalt zurückgegriffen werden.

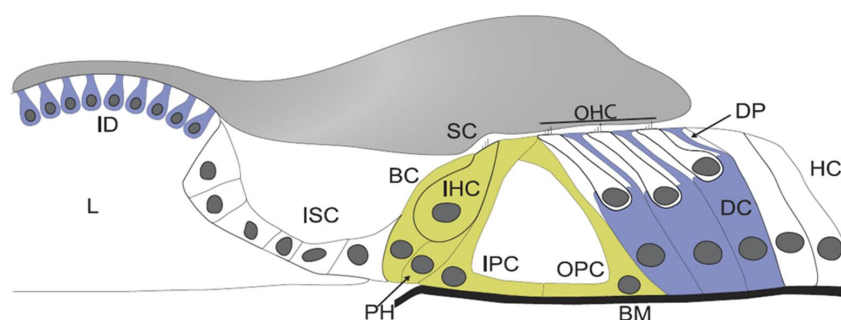
## 6.4 Lokalisation und Expression von CEACAM16 in der Cochlea

Um die Untersuchungen zur Lokalisation von CEACAM16 durchzuführen, wurde mit der Firma Aldevron mittels genetischer Immunisierung von Mäusen ein monoklonaler Antikörper gegen humanes CEACAM16 hergestellt. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits mit dieser Methode ein polyklonales Immunserum gegen murines CEACAM16 hergestellt (Krupar, 2012). Der monoklonale Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich seiner Eigenschaften untersucht. Es zeigte sich eine am ehesten in der hohen Konservierung des Antigens begründete Kreuzreaktion mit dem murinen Zielprotein. Das Bindungsepitop des Antikörpers liegt im Bereich der N-terminalen Hälfte von CEACAM16. Dies sollte vor allem bei Untersuchungen mit artifiziell erzeugten CEACAM16-Fragmenten berücksichtigt werden, da diesen bei Fehlen der entsprechenden Domänen immer einen Marker z.B. ein myc-Epitop fusioniert werden sollte, um eine histologische Färbung mit Antikörpern gegen dieses Epitop möglich zu machen. Unsere Untersuchungen zeigten eine Anwendbarkeit des Antikörpers 9D5 sowohl auf paraffineingebetten als auch gefrierkonservierten Geweben. Dies ist für weiterführende Untersuchungen, z.B. für Doppelfärbungen mit anderen Antikörpern welche unter Umständen nur für Paraffin- oder nur für Kryoschnitte geeignet sind, von Bedeutung. Bei der Ver-

wendung auf kryokonservierten Geweben zeigte sich bei gleicher Verdünnung ein deutlich stärkeres Färbesignal und ein stärkerer Hintergrund. Es ist daher davon auszugehen, dass bei dieser Anwendung höhere Verdünnungen als 1:500 mit PBS gewählt werden können. Auch in Western Blot-Analysen wurde der Antikörper inzwischen von unserer Arbeitsgruppe erfolgreich eingesetzt (Kammerer et al., 2012). Bei immunhistologischen Färbungen muriner Gewebe verwendeten wir den Antikörper nach Markierung mit Biotin. Dadurch wird kein sekundärer Antikörper gegen murine Immunglobuline benötigt, was zu einer stärkeren Hintergrundfärbung und zum Auftreten von unspezifischen Färbungen durch Bindungen an gewebeständige Immunglobuline führen könnte. Für die weiteren Funktionsanalysen steht also ein breit einsetzbarer Antikörper mit zuverlässiger Epitop-erkennung zur Verfügung.

Unter Verwendung dieses Antikörpers konnte CEACAM16 eindeutig auf Proteinebene in der Tektorialmembran und auch erstmals in den Interdentalzellen des *Limbus spiralis* lokalisiert werden. Da es sich bei der Tektorialmembran um eine azelluläre Struktur handelt, deren Komponenten durch die Interdentalzellen produziert werden, liegt die Vermutung nahe, dass CEACAM16 in diesen Zellen synthetisiert, im Anschluss sezerniert und in die Tektorialmembran integriert wird. Bei der immunhistochemischen Färbung entsteht jedoch ein eher schwaches Signal im Bereich des apikalen Limbus. Dies kann durch verschiedene Faktoren bedingt sein. CEACAM16 könnte nur in sehr geringer Menge exprimiert oder sehr rasch aus der Zelle ausgeschleust werden. In diesem Falle wäre die Proteinkonzentration in den Zellen sehr gering und die durch uns etablierte Färbemethode unter Umständen nicht genügend empfindlich. Auch eine Expression von CEACAM16 in größeren Mengen ausschließlich während bestimmter Entwicklungsstadien oder bis zu einem bestimmten Alter ist eine Möglichkeit. Durch die Paraffineinbettung liegen die Proteine nicht mehr in ihrer nativen Form vor, was ebenfalls ein Grund sein könnte, warum das Färbesignal abgeschwächt ist. Hier wäre die Verwendung von kryokonservierten Geweben eine Alternative. Diese Umstände lassen die Möglichkeit offen, dass CEACAM16 auch noch in weiteren Zellarten exprimiert wird, welche in den immunhistochemischen Experimenten noch nicht nachgewiesen wurden. Die erstmalige Detektion von CEACAM16 auf Proteinebene in einer zellulären Struktur stellt einen entscheidenden Baustein im Verständnis der Funktion von CEACAM16 dar. Durch weiterführende

Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe gelang es die Lokalisation und Expression von CEACAM16 noch genauer zu bestimmen. Bei immunhistologischen Untersuchungen von Geweben junger Mäuse ließ sich CEACAM16-Protein erst ab dem zwölften Tag nach der Geburt nachweisen. Eine Anfärbung der kompletten Tektorialmembran war erst ab dem fünfzehnten bis achtzehnten Tag post partum zu beobachten. Neben der Tektorialmembran und den Interdentalzellen ist das Protein in den Deiters-Zellen und eventuell auch den äußeren Haarzellen nachweisbar. Die Expression wurde durch in-situ-Hybridisierung an Corti-Organen von zwölf Tage alten Ratten untersucht. Die CEACAM16-mRNA wurde hauptsächlich in den Interdentalzellen sowie den Deiters-Zellen und in geringeren Mengen in den inneren Haarzellen, den inneren Phalangealzellen und den Pfeilerzellen nachgewiesen, wobei die Expression nicht nur bei jungen sondern auch bei älteren Tieren erfolgt. Abbildung 6.2 gibt einen schematischen Überblick über die Zellarten der Cochlea, ihre Lokalisation und ihre CEACAM16-Expression (Kammerer et al., 2012). Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe widersprechen dabei teilweise denen von Zheng et al., die die CEACAM16-Expression in den äußeren Haarzellen gefunden haben (Zheng et al., 2011). Diese Unterschiede könnten durch die Nähe der Deiters-Zellen mit ihren apikalen Zellausläufern zu den äußeren Haarzellen und dadurch entstehende Signalüberlagerungen bei der in-situ-Hybridisierung erklärt werden.



**Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der Cochlea mit ihren unterschiedlichen Zelltypen.** CEACAM16-Expression konnte in den Interdentalzellen, den Deiters-Zellen und in geringeren Mengen auch in den inneren Haarzellen und den Pfeilerzellen nachgewiesen werden. Grün markierte Zellen exprimieren geringe Mengen CEACAM16, blau markierte Zellen größere Mengen. *BM*: Basalmembran; *BC*: innere Grenzzellen; *DC*: Deiters Zellen (äußere Phalangealzellen); *DP*: Ausläufer der Deiters Zellen, welche die Membrana reticularis bilden; *HC*: Hensen-Zellen; *ID*: Interdentalzellen; *IHC*: innere Haarzellen; *IPC*: innere Pfeilerzellen; *ISC*: innerer Spiralsulcus; *L*: limbus spiralis; *OHC*: äußere Haarzellen; *OPC*: äußere Pfeilerzellen; *PH*: innere Phalangealzellen; *SC*: Stereozilien (Quelle: (Kammerer et al., 2012))

Die Interdentalzellen liegen als eine Einzelzellschicht an der Oberfläche des Spirallimbus und haben unter anderem die Aufgabe die Bestandteile der Tektorialmembran zu synthetisieren und zu sezernieren. Schon früh ging man davon aus, dass diese Zellen metabolisch sehr aktiv sind und an ihrer Oberfläche Vesikel mit intrazellulär hergestellten Material in die Endolymphe freisetzen. Dies geschieht schon während der Entwicklung des Innenohres beim Fötus und setzt sich bis ins Erwachsenenalter fort. Sie sind dabei an der Ionen- und Flüssigkeitsbalance der Endolymphe und dem kontrollierten Austausch mit der Perilymphe beteiligt (Lim, 1970; Arnold und Vosteen, 1973; Thorn et al., 1979; Steel, 1983; Kimura et al., 1990; Yamashita et al., 1992; Ulfendahl et al., 2000). Die Deiters-Zellen, die Pfeilerzellen und innere Phalangealzellen zählen zu den Stützzellen des Corti-Organs. Sie umgeben die inneren und äußeren Haarzelle und bilden mit ihren, durch ein ausgeprägtes Zytoskelett versteiften, Zellkörpern ein "Bett" für die Sinneszellen. Mit ihren apikalen Ausläufern bilden die Deiters-Zellen die *Membrana reticularis*. Diese dient der Stabilisierung des hochkomplizierten Corti-Organs gegenüber den Kräften durch die Schalleinwirkung und als Diffusionsbarriere für die kaliumreiche Endolymphe zum Extrazellularraum unterhalb der *Membrana reticularis*. Die große Bedeutung der Stützzellen zeigt sich darin, dass eine Schädigung dieser zu einem Verlust von Haarzellen und somit zum Hörverlust führt (Tolomeo und Holley, 1997; Lüllmann-Rauch, 2003; Mellado Lagarde et al., 2013). Die zentrale Bedeutung der inneren Haarzellen beim Hörvorgang durch Umwandlung des Schallsignals in ein neuronales Signal, welches dann über den Hörnerven zum Gehirn weitergeleitet wird ist in Abschnitt 1.1.2 beschrieben. Die Zelltypen, in welchen CEACAM16-Expression gezeigt wurde und auch ein Nachweis auf Proteinebene gelungen ist tragen entscheidend zum Hörvorgang bei.

In Voruntersuchungen war der Nachweis von CEACAM16-mRNA in der lateralen Wand (a.e. der *Stria vascularis* entsprechend) humaner Innenohren gelungen (Krupar, 2012). Diese Ergebnisse konnten weder durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistologischen Färbungen noch durch später erfolgte in-situ-Hybridisierungen für adulte Mäuse nachvollzogen werden.

Bei der immunhistologischen Untersuchung humaner Innenohrgewebe gelang die Detektion von CEACAM16 in der Tektorialmembran, jedoch nicht in den Interdentalzellen oder der *Stria vascularis*. Dies könnte mit dem nicht optimalen Strukturerehalt der uns

zur Verfügung stehenden Gewebeschnitte in Zusammenhang stehen oder Ausdruck einer abweichenden Lokalisation beim Menschen sein. Um sichere Aussagen über die Lokalisation des humanen Proteins treffen zu können ist es notwendig, Methoden zu entwickeln, humane Innenohren aus dem Schädelknochen zu isolieren, zu fixieren und histologisch aufzuarbeiten. Dabei muss ein besserer Erhalt der Morphologie erreicht werden, damit eine sicherere Zuordnung der CEACAM16 positiven Strukturen und eventuell die Identifizierung von zellulären Strukturen möglich ist. Es besteht somit eine Diskrepanz zwischen der Expression und Lokalisation von CEACAM16 beim Menschen und bei der Maus, welche bisher ungeklärt bleibt.

## 6.5 Mutationen im CEACAM16-Gen führen zu genetisch bedingter Taubheit

Das spezifische Expressionsmuster von CEACAM16 in Zusammenschau mit der von uns nachgewiesenen Lokalisation in der Tektorialmembran, den Interdentalzellen und den Stützzellen der Cochlea lässt auf eine essentielle Funktion von CEACAM16 beim Hörvorgang schließen und machen CEACAM16 zu einem Kandidaten für die Vermittlung von genetisch bedingter nicht-syndromischer Taubheit (NSHL).

Das CEACAM16-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 19 und somit innerhalb des im Abschnitt 1.5 genauer erläuterten DFNA4-Locus für autosomal-dominant vererbte nicht-syndromische Taubheit. Neben den bereits identifizierten Mutationen im MYO14-Gen muss es noch mindestens ein weiteres Gen innerhalb dieses Bereiches geben, welches NSHL vermittelt. Genetische Diagnostik einer nordamerikanischen Familie zeigte bei intaktem MYO14-Gen einen Aminosäureaustausch von Threonin zu Prolin in Position 140 der CEACAM16-Aminosäuresequenz im Bereich der IgC-ähnlichen A-Domäne, wodurch ein konserviertes Motiv für eine N-Glykosylierungsstelle verloren geht. Diese spielt eine wichtige Rolle bei der korrekten Faltung, der Stabilität und beim Abbau mutierter oder beschädigter Proteine (Imperiali und O'Connor, 1999; Helenius und Aebi, 2001; Zheng et al., 2011). Der Phänotyp der Familie wurde als moderate late-onset Hörminderung mit einem Hörverlust von bis zu 50 dB in allen Frequenzbereichen und einer Beeinträchtigung der intracochleären Verstärkung beschrieben (Chen et al., 1995).

Es ist denkbar, dass ein fehlgefaltetes oder instabiles CEACAM16 eventuell auch durch Akkumulation zu dieser progredienten Hörminderung führt. Diese Beobachtung geht konform mit den Ergebnissen, welche sich bei Untersuchungen mittels Messung von akustisch evozierten Hirnstammpotentialen und distorsiv produzierten, otoakustischen Emissionen an CEACAM16-Nullmutanten und Wildtypmäusen in unserem Arbeitskreis zeigten. Hier konnten bereits bei jungen Tieren eine höhere Hörschwelle für sehr hohe und sehr tiefe Frequenzen in Verbindung mit einer reduzierten intracochleären Verstärkung gezeigt werden, welche im Alter noch weiter zunimmt (Kammerer et al., 2012).

Die reduzierte intracochleäre Verstärkung könnte auf eine veränderte Membranarchitektur, -steifigkeit oder -stabilität zurückzuführen sein. Die Steifigkeit der Membran nimmt vom Spirallimbus zu den Randbereichen und von apikal nach basal hin ab, was durch die Änderung der Menge an und der Orientierung der Kollagenfasern begründet wird (Weaver und Schweitzer, 1994; Gueta et al., 2006; Masaki et al., 2006; Gueta et al., 2007). Diese Unterschiede in der Beschaffenheit und daraus resultierend den physikalischen Eigenschaften der Tektorialmembran entlang ihres Verlaufes sind wichtig für ihre Funktion bei der Signaltransduktion (Richter et al., 2007; Gavara und Chadwick, 2009). Inzwischen geht man von einer aktiven Beteiligung an der Signaltransduktion durch frequenzabhängige radiäre und fortlaufende longitudinale Wellen aus (Fukazawa et al., 1999; Ghaffari et al., 2007). Hierzu sind eine radiäre Steifigkeit bei gleichzeitiger longitudinaler Verformbarkeit notwendig, ein Phänomen, welches als Anisotropie der Tektorialmembran bezeichnet und bisher auf die Anordnung der Kollagenfasern Typ II in Zusammenspiel mit den anderen Kollagenfasertypen zurückgeführt wird (Masaki et al., 2009). Bei den immunhistologischen Untersuchungen konnten wir die Beobachtung machen, dass die Tektorialmembran bei CEACAM16-Nullmutanten häufiger nicht mehr auf den Haarzellen auflag, sondern sich in Richtung des Limbus spiralis zurückgezogen hatte (Kammerer et al., 2012), was für eine Änderung dieser essentiellen Membraneigenschaften spricht. Auch die Interaktion von CEACAM16 mit  $\alpha$ -Tectorin gibt einen Hinweis auf einen Zusammenhang von CEACAM16 und der Membranarchitektur.

Der oben beschriebene Phänotyp mit Hörstörungen in den Grenzbereichen der hörbaren Frequenzen lässt sich gut mit einer Veränderung der Tektorialmembran in Einklang bringen, da diese vor allem der Frequenzselektion und der Reizverstärkung dient. Ein Funk-

tionsverlust macht sich also gerade dann bemerkbar, wenn eine Signalverstärkung benötigt wird, wobei keine vollständige Taubheit resultiert.

Unsere Ergebnisse unterstützen die These, dass ein Verlust der Funktion von CEACAM16 zu nicht-syndromischer Taubheit mit Assoziation zum DFNA4-Locus führt.

## 7 Zusammenfassung

CEACAM16 zeigt eine vorwiegende Expression im Innenohr, was eine essentielle Funktion dieses Proteins beim Gehörvorgang nahe legt. Diese Annahme wird durch das Vorhandensein orthologer Gene bei allen bisher untersuchten Säugern und durch die hohe Konservierung zwischen den einzelnen Spezies unterstützt. Seine Lokalisation auf dem humanen Chromosom 19 innerhalb des 1.4 Mb großen, autosomal-dominant vererbten Taubheitslocus 4 (DFNA4) machen CEACAM16 zu einem Kandidaten für die Vermittlung von nicht-syndromischer Taubheit.

Im Rahmen dieser Arbeit wiesen wir die Expression von CEACAM16 sowie weiterer Mitglieder der CEA-Familie durch Detektion der mRNA von CEACAM1, CEACAM10, CEACAM14, CEACAM16, CEACAM17 und CEACAM20 im Innenohr nach. Des Weiteren konnte die Lokalisation von CEACAM16 weiter spezifiziert werden. Hierzu wurde ein kommerziell entwickelter monoklonaler Antikörper näher charakterisiert. Wir zeigten, dass der Antikörper 9D5 ein Epitop innerhalb der N1- und A-Domäne detektiert, welches sowohl im nativen als auch denaturierten Zustand erkannt wird, wodurch der Antikörper 9D5 für die Immunhistologie an Gefrierschnitten und paraffineingebetteten Geweben geeignet ist. Die Lokalisation des CEACAM16 in der Tektorialmembran der Maus konnte nun durch Färbungen an CEACAM16-Nullmutanten eindeutig bestätigt und erstmals auch an humanen Geweben gezeigt werden. Es gelang uns darüber hinaus CEACAM16 in den Interdentalzellen des murinen Innenohres, welche die extrazelluläre Matrix der Tektorialmembran synthetisieren, auf Proteinebene nachzuweisen.

In Voruntersuchungen hatte es Hinweise auf eine Lokalisation von CEACAM16 im Kleinhirn gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste immunhistologische Färbungen eine Lokalisation von CEACAM16 im Bereich des Marklagers und Hinweise auf eine Lokalisation innerhalb der Purkinjezellen zeigen. Hier sollten weitere Analysen zur Rolle des Proteins in diesem Organ erfolgen.

Funktionell zeigten wir eine homophile Interaktion sowohl von murinem als auch von humanem CEACAM16 in einem Zelladhäsionsmodell. Hierbei ergaben sich Hinweise, dass die Interaktion beim murinen Protein stärker ausgeprägt ist als beim humanen.



Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass CEACAM16 einen integralen Bestandteil der Tektorialmembran darstellt und als Dimere vorliegt. Ein Fehlen von CEACAM16 könnte daher die physikalischen Eigenschaften der Tektorialmembran verändern und so Auswirkungen auf das Hörvermögen haben. Diese Annahme wird durch weiterführende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe untermauert (Kammerer et al., 2012).



# Literatur

- Ahmed, Z. M., Yousaf, R., Lee, B. C., Khan, S. N., Lee, S., Lee, K., Husnain, T., Rehman, A. U., Bonneux, S., Ansar, M., Ahmad, W., Leal, S. M., Gladyshev, V. N., Belyantseva, I. A., Camp, G. V., Riazuddin, S., Friedman, T. B., und Riazuddin, S. (2011). Functional null mutations of {MSRB3} encoding methionine sulfoxide reductase are associated with human deafness {DFNB74}. *The American Journal of Human Genetics*, 88(1):19 – 29.
- Angeli, S., Lin, X., und Liu, X. Z. (2012). Genetics of hearing and deafness. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295(11):1812–1829.
- Arnold, W. und Vosteen, K. H. (1973). [secretory activity of the interdental cells in the spiral lamina]. *Acta Otolaryngol*, 75(2):192–202.
- Ashmore, J. (2008). Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev*, 88(1):173–210.
- Assad, J. A., Shepherd, G. M., und Corey, D. P. (1991). Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron*, 7(6):985–94.
- Ballana, E., Ventayol, M., Rabionet, R., Gasparini, P., und Estivill, X. (2013). Connexins and deafness homepage. <http://www.crg.es/deafness>.
- Ballesta, A. M., Molina, R., Filella, X., Jo, J., und Gimenez, N. (1995). Carcinoembryonic antigen in staging and follow-up of patients with solid tumors. *Tumour Biol*, 16(1):32–41.
- Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarstrom, S., Holmes, K. V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S. H., Lucka, L., Najjar, S. M., Neumaier, M., Obrink, B., Shively, J. E., Skubitz, K. M., Stanners, C. P., Thomas, P., Thompson, J. A., Virji, M., von Kleist, S., Wagener, C., Watt, S., und Zimmermann, W. (1999). Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res*, 252(2):243–9.
- Bebo, B. F., J. und Dveksler, G. S. (2005). Evidence that pregnancy specific glycoproteins regulate t-cell function and inflammatory autoimmune disease during pregnancy. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(2):231–7.
- Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., und Stanners, C. P. (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, 57(2):327–334.

- Birkenhager, R., Aschendorff, A., Schipper, J., und Laszig, R. (2007). [non-syndromic hereditary hearing impairment]. *Laryngorhinootologie*, 86(4):299–309.
- Bitner-Glindzicz, M. (2002). Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull*, 63:73–94.
- Brownell, W. E., Bader, C. R., Bertrand, D., und de Ribaupierre, Y. (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science*, 227(4683):194–6.
- Chapin, C., Bailey, N. A., Gonzales, L. W., Lee, J.-W., Gonzalez, R. F., und Ballard, P. L. (2012). Distribution and surfactant association of carcinoembryonic cell adhesion molecule 6 in human lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 302(2):L216–L225.
- Chen, A. H., Ni, L., Fukushima, K., Marietta, J., O’Neill, M., Coucke, P., Willems, P., und Smith, R. J. (1995). Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19. *Hum Mol Genet*, 4(6):1073–6.
- Chen, C. W. und Thomas, C. A., J. (1980). Recovery of dna segments from agarose gels. *Anal Biochem*, 101(2):339–41.
- Chen, T. und Gotschlich, E. C. (1996). Cgm1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25):14851–6.
- Chen, T., Zimmermann, W., Parker, J., Chen, I., Maeda, A., und Bolland, S. (2001). Biliary glycoprotein (bgpa, cd66a, ceacam1) mediates inhibitory signals. *J Leukoc Biol*, 70(2):335–40.
- Chen, W., Kahrizi, K., Meyer, N. C., Riazalhosseini, Y., Van Camp, G., Najmabadi, H., und Smith, R. J. (2005). Mutation of col11a2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the dfnb53 locus. *J Med Genet*, 42(10):e61.
- Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Leibovici, M., und Petit, C. (1997). Otogelin: a glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14450–5.
- Dallos, P., Billone, M. C., Durrant, J. D., Wang, C., und Raynor, S. (1972). Cochlear inner and outer hair cells: functional differences. *Science*, 177(4046):356–8.
- Deans, M. R., Peterson, J. M., und Wong, G. W. (2010). Mammalian otolin: a multimeric glycoprotein specific to the inner ear that interacts with otoconial matrix protein otoconin-90 and cerebellin-1. *PLoS One*, 5(9):e12765.
- Donaudy, F., Snoeckx, R., Pfister, M., Zenner, H. P., Blin, N., Di Stazio, M., Ferrara, A., Lanzara, C., Ficarella, R., Declau, F., Pusch, C. M., Nurnberg, P., Melchionda, S., Zelante, L., Ballana, E., Estivill, X., Van Camp, G., Gasparini, P., und Savoia, A. (2004). Nonmuscle myosin heavy-chain gene myh14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (dfna4). *Am J Hum Genet*, 74(4):770–6.
- Durocher, Y., Perret, S., und Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-ebna1 cells. *Nucleic Acids Res*, 30(2):E9.

- Eidelman, F. J., Fuks, A., DeMarte, L., Taheri, M., und Stanners, C. P. (1993). Human carcinoembryonic antigen, an intercellular adhesion molecule, blocks fusion and differentiation of rat myoblasts. *J Cell Biol*, 123(2):467–75.
- Eisenried, A. (2009). *Charakterisierung von CEACAM20, einer potenziellen Zielstruktur für die Tumorimmuntherapie*. Dissertation, Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ergun, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Gotze, J., Wurmbach, J. H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M., und Wagener, C. (2000). Cea-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell*, 5(2):311–20.
- Everett, L. A., Glaser, B., Beck, J. C., Idol, J. R., Buchs, A., Heyman, M., Adawi, F., Hazani, E., Nassir, E., Baxeavanis, A. D., Sheffield, V. C., und Green, E. D. (1997). Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (pds). *Nat Genet*, 17(4):411–22.
- Fettiplace, R. und Hackney, C. M. (2006). The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci*, 7(1):19–29.
- Frängsmyr, L., Baranov, V., und Hammarstrom, S. (1999). Four carcinoembryonic antigen subfamily members, cea, nca, bgp and cgm2, selectively expressed in the normal human colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat. *Tumour Biol*, 20(5):277–92.
- Fukazawa, T., Ishida, K., und Murai, Y. (1999). A micromechanical model of the cochlea with radial movement of the tectorial membrane. *Hear Res*, 137(1-2):59–67.
- Gavara, N. und Chadwick, R. S. (2009). Collagen-based mechanical anisotropy of the tectorial membrane: implications for inter-row coupling of outer hair cell bundles. *PLoS One*, 4(3):e4877.
- Ghaffari, R., Aranyosi, A. J., und Freeman, D. M. (2007). Longitudinally propagating traveling waves of the mammalian tectorial membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(42):16510–5.
- Gillespie, P. G. und Walker, R. G. (2001). Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*, 413(6852):194–202.
- Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R., und Adelstein, R. S. (2004). Identification and characterization of nonmuscle myosin ii-c, a new member of the myosin ii family. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4):2800–2808.
- Gueta, R., Barlam, D., Shneck, R. Z., und Rousso, I. (2006). Measurement of the mechanical properties of isolated tectorial membrane using atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(40):14790–5.
- Gueta, R., Tal, E., Silberberg, Y., und Rousso, I. (2007). The 3d structure of the tectorial membrane determined by second-harmonic imaging microscopy. *J Struct Biol*, 159(1):103–10.

- Hammarstrom, S. (1999). The carcinoembryonic antigen (cea) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*, 9(2):67–81.
- Han, E., Phan, D., Lo, P., Poy, M. N., Behringer, R., Najjar, S. M., und Lin, S. H. (2001). Differences in tissue-specific and embryonic expression of mouse ceacam1 and ceacam2 genes. *Biochem. J.*, 355(2):417–423.
- Hauck, C. R., Agerer, F., Muenzner, P., und Schmitter, T. (2006). Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. *Eur J Cell Biol*, 85(3-4):235–42.
- Hauck, C. R., Meyer, T. F., Lang, F., und Gulbins, E. (1998). Cd66-mediated phagocytosis of opa52 neisseria gonorrhoeae requires a src-like tyrosine kinase- and rac1-dependent signalling pathway. *EMBO J*, 17(2):443–54.
- Helenius, A. und Aebi, M. (2001). Intracellular functions of n-linked glycans. *Science*, 291(5512):2364–9.
- Hemmert, W., Zenner, H. P., und Gummer, A. W. (2000). Three-dimensional motion of the organ of corti. *Biophys J*, 78(5):2285–97.
- Hibino, H. und Kurachi, Y. (2006). Molecular and physiological bases of the k+ circulation in the mammalian inner ear. *Physiology*, 21(5):336–345.
- Hildebrand, M. S., Mor  n, M., Meyer, N. C., Mayo, F., Modamio-Hoybj  r, S., Menc  a, A., Olavarrieta, L., Morales-Angulo, C., Nishimura, C. J., Workman, H., DeLuca, A. P., del Castillo, I., Taylor, K. R., Tompkins, B., Goodman, C. W., Schrauwen, I., Wesemael, M. V., Lachlan, K., Shearer, A. E., Braun, T. A., Huygen, P. L., Kremer, H., Van Camp, G., Moreno, F., Casavant, T. L., Smith, R. J., und Moreno-Pelayo, M. A. (2011). Dfna8/12 caused by tecta mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss. *Human Mutation*, 32(7):825–834.
- Hone, S. W. und Smith, R. J. (2001). Genetics of hearing impairment. *Semin Neonatol*, 6(6):531–41.
- Horst, A. K. und Wagener, C. (2004). Cea-related cams. *Handb Exp Pharmacol*, 165:283–341.
- Hudspeth, A. J. (1985). The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science*, 230(4727):745–52.
- Ilantzis, C., DeMarte, L., Screatton, R. A., und Stanners, C. P. (2002). Deregulated expression of the human tumor marker cea and cea family member ceacam6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia*, 4(2):151–63.
- Ilantzis, C., Jothy, S., Alpert, L. C., Draber, P., und Stanners, C. P. (1997). Cell-surface levels of human carcinoembryonic antigen are inversely correlated with colonocyte differentiation in colon carcinogenesis. *Lab Invest*, 76(5):703–16.
- Imperiali, B. und O’Connor, S. E. (1999). Effect of n-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(6):643 – 649.

- Iurato, S. (1967). Electron optical structure of the inner ear membranes in reference to their suitability for metabolic interchange. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd*, 189(1):113–26.
- Kammerer, R., Rüttiger, L., Riesenberger, R., Schäuble, C., Krupar, R., Kamp, A., Sunami, K., Eisenried, A., Hennenberg, M., Grunert, F., Bress, A., Battaglia, S., Schrewe, H., Knipper, M., Schneider, M. R., und Zimmermann, W. (2012). Loss of mammal-specific tectorial membrane component carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 16 (ceacam16) leads to hearing impairment at low and high frequencies. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26):21584–21598.
- Kammerer, R., Stober, D., Singer, B. B., Obrink, B., und Reimann, J. (2001). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of t cell stimulation. *J Immunol*, 166(11):6537–44.
- Kammerer, R. und Zimmermann, W. (2010). Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC Biol*, 8:12.
- Kataoka, K., Takata, Y., Nakajima, A., Saito, S., und Huh, N. (2000). A carcinoembryonic antigen family cDNA from mouse placenta encoding a protein with a rare domain composition. *Placenta*, 21(7):610–4.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., und Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387(6628):80–3.
- Kikuchi, T., Adams, J. C., Miyabe, Y., So, E., und Kobayashi, T. (2000). Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Medical Electron Microscopy*, 33(2):51–56.
- Killick, R., Legan, P. K., Malenczak, C., und Richardson, G. P. (1995). Molecular cloning of chick beta-tectorin, an extracellular matrix molecule of the inner ear. *J Cell Biol*, 129(2):535–47.
- Kimura, R. S., Nye, C. L., und Southard, R. E. (1990). Normal and pathologic features of the limbus spiralis and its functional significance. *Am J Otolaryngol*, 11(2):99–111.
- Klaile, E., Müller, M. M., Kannicht, C., Singer, B. B., und Lucka, L. (2005). Ceacam1 functionally interacts with filamin A and exerts a dual role in the regulation of cell migration. *Journal of Cell Science*, 118(23):5513–5524.
- Klaile, E., Vorontsova, O., Sigmundsson, K., Müller, M. M., Singer, B. B., Öfverstedt, L.-G., Svensson, S., Skoglund, U., und Obrink, B. (2009). The ceacam1 n-terminal Ig domain mediates cis- and trans-binding and is essential for allosteric rearrangements of ceacam1 microclusters. *The Journal of Cell Biology*, 187(4):553–567.
- Kopp, P. (1999). Pendred’s syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition. *Thyroid*, 9(1):65–9.
- Krupar, R. F. A. (2012). *Expressionsanalyse von CEACAM16, einem neu entdeckten Hörigen des Innenohrs*. Dissertation, Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

- Kuespert, K., Pils, S., und Hauck, C. R. (2006). Ceacams: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol*, 18(5):565–71.
- Lawrence, M. (1982). Structure and function of the ear and auditory nervous system. *Environ Health Perspect*, 44:9–13.
- Leal, A., Endeley, S., Stengel, C., Huehne, K., Loetterle, J., Barrantes, R., Winterpacht, A., und Rautenstrauss, B. (2003). A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3. *Gene*, 312(0):165 – 171.
- Legan, P. K., Rau, A., Keen, J. N., und Richardson, G. P. (1997). The mouse tectorins. modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *J Biol Chem*, 272(13):8791–801.
- Leslie, K. K., Watanabe, S., Lei, K. J., Chou, D. Y., Plouzek, C. A., Deng, H. C., Torres, J., und Chou, J. Y. (1990). Linkage of two human pregnancy-specific beta 1-glycoprotein genes: one is associated with hydatidiform mole. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15):5822–6.
- Leung, N., Turbide, C., Balachandra, B., Marcus, V., und Beauchemin, N. (2008). Intestinal tumor progression is promoted by decreased apoptosis and dysregulated wnt signaling in ceacam1-/- mice. *Oncogene*, 27(36):4943–53.
- Lim, D. J. (1970). Morphology and function of the interdental cell—an ultrastructural observation. *J Laryngol Otol*, 84(12):1241–56.
- Lim, D. J. (1986). Functional structure of the organ of corti: a review. *Hear Res*, 22:117–46.
- Lippert, H. und Deller, T. (2003). *Lehrbuch Anatomie : 183 Tabellen*. Urban & Fischer, München, 6., überarb. aufl. edition.
- Lüllmann-Rauch, R. (2003). *Histologie : Verstehen, Lernen, Nachschlagen ; 10 Tabellen*. Thieme, Stuttgart.
- Mahon, M. J. (2011). Vectors bicistronically linking a gene of interest to the sv40 large t antigen in combination with the sv40 origin of replication enhance transient protein expression and luciferase reporter activity. *Biotechniques*, 51(2):119–28.
- Marshall, K. L. und Lumpkin, E. A. (2012). The molecular basis of mechanosensory transduction. *Adv Exp Med Biol*, 739:142–55.
- Martinez, A. D., Acuna, R., Figueroa, V., Maripillan, J., und Nicholson, B. (2009). Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antioxid Redox Signal*, 11(2):309–22.
- Masaki, K., Gu, J. W., Ghaffari, R., Chan, G., Smith, R. J., Freeman, D. M., und Aranyosi, A. J. (2009). Col11a2 deletion reveals the molecular basis for tectorial membrane mechanical anisotropy. *Biophys J*, 96(11):4717–24.
- Masaki, K., Weiss, T. F., und Freeman, D. M. (2006). Poroelastic bulk properties of the tectorial membrane measured with osmotic stress. *Biophys J*, 91(6):2356–70.



- Masindova, I., Varga, L., Stanik, J., Valentinova, L., Profant, M., Klimes, I., und Gasperikova, D. (2012). Molecular and hereditary mechanisms of sensorineural hearing loss with focus on selected endocrinopathies. *Endocr Regul*, 46(3):167–86.
- Mazzol, i. M., Van Camp, G., Newton, V., Giarbini, N. and Declau, F., und Parving, A. (2003). Recommendations for the description of genetic and audiological data for families with nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Audiological Medicine*, 1(2):148–50.
- McCaw, S. E., Schneider, J., Liao, E. H., Zimmermann, W., und Gray-Owen, S. D. (2003). Immunoreceptor tyrosine-based activation motif phosphorylation during engulfment of neisseria gonorrhoeae by the neutrophil-restricted ceacam3 (cd66d) receptor. *Mol Microbiol*, 49(3):623–37.
- McGuirt, W. T., Prasad, S. D., Griffith, A. J., Kunst, H. P. M., Green, G. E., Shpargel, K. B., Runge, C., Huybrechts, C., Mueller, R. F., Lynch, E., King, M.-C., Brunner, H. G., Cremers, C. W. R. J., Takanosu, M., Li, S.-W., Arita, M., Mayne, R., Prockop, D. J., Camp, G. V., und Smith, R. J. H. (1999). Mutations in *coll1a2* cause non-syndromic hearing loss (dfna13). *Nat Genet*, 23(4):413–419.
- McLellan, A. S., Fischer, B., Dveksler, G., Hori, T., Wynne, F., Ball, M., Okumura, K., Moore, T., und Zimmermann, W. (2005). Structure and evolution of the mouse pregnancy-specific glycoprotein (psg) gene locus. *BMC Genomics*, 6:4.
- Mellado Lagarde, M. M., Cox, B. C., Fang, J., Taylor, R., Forge, A., und Zuo, J. (2013). Selective ablation of pillar and deiters’ cells severely affects cochlear postnatal development and hearing in mice. *The Journal of Neuroscience*, 33(4):1564–1576.
- Messick, C. A., Sanchez, J., DeJulius, K. L., Hammel, J., Ishwaran, H., und Kalady, M. F. (2010). Ceacam-7: A predictive marker for rectal cancer recurrence. *Surgery*, 147(5):713–719.
- Mhatre, A. N., Li, J., Chen, A. F., Yost, C. S., Smith, R. J., Kindler, C. H., und Lalwani, A. K. (2004). Genomic structure, cochlear expression, and mutation screening of *knk6*, a candidate gene for dfna4. *Journal of Neuroscience Research*, 75(1):25–31.
- Michaelidou, K., Tzovaras, A., Missitzis, I., Ardavanis, A., und Scorilas, A. (2013). The expression of the ceacam19 gene, a novel member of the cea family, is associated with breast cancer progression. *Int J Oncol*, 42(5):1770–7.
- Mirghomizadeh, F., Bardtke, B., Devoto, M., Pfister, M., Oeken, J., Konig, E., Vitale, E., Riccio, A., De Rienzo, A., Zenner, H. P., und Blin, N. (2002). Second family with hearing impairment linked to 19q13 and refined dfna4 localisation. *Eur J Hum Genet*, 10(2):95–9.
- Morton, N. E. (1991). Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci*, 630:16–31.
- Mustapha, M., Weil, D., Chardenoux, S., Elias, S., El-Zir, E., Beckmann, J. S., Loiselet, J., und Petit, C. (1999). An  $\alpha$ -tectorin gene defect causes a newly identified autosomal

- recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, dfnb21. *Human Molecular Genetics*, 8(3):409–412.
- Nadol, J. B. (1993). Hearing loss. *New England Journal of Medicine*, 329(15):1092–1102.
- Naftalin, L., Harrison, M. S., und Stephens, A. (1963). Character of the tectorial membrane. *Lancet*, 1(7292):1192.
- Nagel, G., Grunert, F., Kuijpers, T. W., Watt, S. M., Thompson, J., und Zimmermann, W. (1993). Genomic organization, splice variants and expression of cgm1, a cd66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family. *Eur J Biochem*, 214(1):27–35.
- Najjar, S. M. (2002). Regulation of insulin action by ceacam1. *Trends Endocrinol Metab*, 13(6):240–5.
- Nap, M., Mollgard, K., Burtin, P., und Fleuren, G. J. (1988). Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumour Biol*, 9(2-3):145–53.
- Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P., und Wagener, C. (1993). Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22):10744–8.
- Nittka, S., Bohm, C., Zentgraf, H., und Neumaier, M. (2008). The ceacam1-mediated apoptosis pathway is activated by cea and triggers dual cleavage of ceacam1. *Oncogene*, 27(26):3721–3728.
- Nittka, S., Gunther, J., Ebisch, C., Erbersdobler, A., und Neumaier, M. (2004). The human tumor suppressor ceacam1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 23(58):9306–9313.
- Noben-Trauth, K., Zheng, Q. Y., und Johnson, K. R. (2003). Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nat Genet*, 35(1):21–3.
- Obrink, B. (1997). Cea adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol*, 9(5):616–26.
- Olsen, A., Teglund, S., Nelson, D., Gordon, L., Copeland, A., Georgescu, A., Carrano, A., und Hammarstrom, S. (1994). Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region. *Genomics*, 23(3):659–68.
- Ordenez, C., Screaton, R. A., Ilantzis, C., und Stanners, C. P. (2000). Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Research*, 60(13):3419–3424.
- Ou, G., Baranov, V., Lundmark, E., Hammarström, S., und Hammarström, M.-L. (2009). Contribution of intestinal epithelial cells to innate immunity of the human gut - studies on polarized monolayers of colon carcinoma cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69(2):150–161.

- Pan, H. und Shively, J. E. (2010). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulates granulopoiesis by inhibition of granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Immunity*, 33(4):620–31.
- Paptistella, M. (2009). *CEACAM20, ein potentielles Zielmolekül für die Immuntherapie von Prostatakarzinompatienten*. Dissertation, Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Pasqualetto, E., Aiello, R., Gesiot, L., Bonetto, G., Bellanda, M., und Battistutta, R. (2010). Structure of the cytosolic portion of the motor protein prestin and functional role of the {STAS} domain in slc26/sulp anion transporters. *Journal of Molecular Biology*, 400(3):448 – 462.
- Pils, S., Gerrard, D. T., Meyer, A., und Hauck, C. R. (2008). Ceacam3: an innate immune receptor directed against human-restricted bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 298(7-8):553–60.
- Preyer, S., Hemmert, W., Pfister, M., Zenner, H. P., und Gummer, A. W. (1994). Frequency response of mature guinea-pig outer hair cells to stereociliary displacement. *Hear Res*, 77(1-2):116–24.
- Pusch, C. M., Meyer, B., Kupka, S., Smith, R. J., Lalwani, A. K., Zenner, H. P., Blin, N., Nurnberg, P., und Pfister, M. (2004). Refinement of the dfna4 locus to a 1.44 mb region in 19q13.33. *J Mol Med (Berl)*, 82(6):398–402.
- Raphael, Y. und Altschuler, R. A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull*, 60(5-6):397–422.
- Richardson, G. P., Lukashkin, A. N., und Russell, I. J. (2008). The tectorial membrane: one slice of a complex cochlear sandwich. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 16(5):458–64.
- Richter, C. P., Emadi, G., Getnick, G., Quesnel, A., und Dallos, P. (2007). Tectorial membrane stiffness gradients. *Biophys J*, 93(6):2265–76.
- Ripellino, J. A., Bailo, M., Margolis, R. U., und Margolis, R. K. (1988). Light and electron microscopic studies on the localization of hyaluronic acid in developing rat cerebellum. *The Journal of Cell Biology*, 106(3):845–855.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. J. (2000). Steve rozen and helen j. skaletsky (2000) primer3 on the www for general users and for biologist programmers. in: Krawetz s, misener s (eds) bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology. humana press, totowa, nj, pp 365-386.
- Rudert, F., Saunders, A. M., Rebstock, S., Thompson, J. A., und Zimmermann, W. (1992). Characterization of murine carcinoembryonic antigen gene family members. *Mamm Genome*, 3(5):262–73.
- Sarantis, H. und Gray-Owen, S. D. (2007). The specific innate immune receptor ceacam3 triggers neutrophil bactericidal activities via a syk kinase-dependent pathway. *Cell Microbiol*, 9(9).

- Saunders, A. M. und Seldin, M. F. (1990a). A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 7. *Genomics*, 8(3):525–35.
- Saunders, A. M. und Seldin, M. F. (1990b). The syntenic relationship of proximal mouse chromosome 7 and the myotonic dystrophy gene region on human chromosome 19q. *Genomics*, 6(2):324–32.
- Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Munzner, P., und Hauck, C. R. (2004). Granulocyte ceacam3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *J Exp Med*, 199(1):35–46.
- Scholzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B., und Thompson, J. (2000). Carcinoembryonic antigen family members ceacam6 and ceacam7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol*, 156(2):595–605.
- Screaton, R. A., Penn, L. Z., und Stanners, C. P. (1997). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, cooperates with myc and bcl-2 in cellular transformation. *J Cell Biol*, 137(4):939–52.
- Smith, R. J., Bale, J. F., J., und White, K. R. (2005). Sensorineural hearing loss in children. *Lancet*, 365(9462):879–90.
- Sohn, W. (2001). Schwerhörigkeit in deutschland, repräsentative hörscreening-untersuchung bei 2000 probanden in 11 allgemeinpraxen. *Zeitung für Allgemeinmedizin*, 77:143–147.
- Steel, K. P. (1983). The tectorial membrane of mammals. *Hear Res*, 9(3):327–59.
- Teglund, S., Zhou, G. Q., und Hammarstrom, S. (1995). Characterization of cDNA encoding novel pregnancy-specific glycoprotein variants. *Biochem Biophys Res Commun*, 211(2):656–64.
- Tekin, M., Arnos, K. S., und Pandya, A. (2001). Advances in hereditary deafness. *Lancet*, 358(9287):1082–90.
- Thalmann, I. (1993). Collagen of accessory structures of organ of corti. *Connect Tissue Res*, 29(3):191–201.
- Thalmann, I., Machiki, K., Calabro, A., Hascall, V. C., und Thalmann, R. (1993). Uronic acid-containing glycosaminoglycans and keratan sulfate are present in the tectorial membrane of the inner ear: functional implications. *Arch Biochem Biophys*, 307(2):391–6.
- Thompson, J., Zimmermann, W., Nollau, P., Neumaier, M., Weber-Arden, J., Schrewe, H., Craig, I., und Willcocks, T. (1994). Cgm2, a member of the carcinoembryonic antigen gene family is down-regulated in colorectal carcinomas. *J Biol Chem*, 269(52):32924–32931.

- Thompson, J., Zimmermann, W., Osthus-Bugat, P., Schleussner, C., Eades-Perner, A. M., Barnert, S., Von Kleist, S., Willcocks, T., Craig, I., Tynan, K., und et al. (1992). Long-range chromosomal mapping of the carcinoembryonic antigen (cea) gene family cluster. *Genomics*, 12(4):761–72.
- Thompson, J. A., Grunert, F., und Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal*, 5(5):344–66.
- Thorn, L., Arnold, W., Schinko, I., und Wetzstein, R. (1979). The limbus spiralis and its relationship to the developing tectorial membrane in the cochlear duct of the guinea pig fetus. *Anat Embryol (Berl)*, 155(3):303–10.
- Tolomeo, J. A. und Holley, M. C. (1997). Mechanics of microtubule bundles in pillar cells from the inner ear. *Biophys J*, 73(4):2241–7.
- Turriziani, M., Fantini, M., Benvenuto, M., Izzi, V., Masuelli, L., Sacchetti, P., Modesti, A., und Bei, R. (2012). Carcinoembryonic antigen (cea)-based cancer vaccines: recent patents and antitumor effects from experimental models to clinical trials. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 7(3):265–96.
- Ulfendahl, M. und Flock, A. A. (1998). Outer hair cells provide active tuning in the organ of corti. *News Physiol Sci*, 13:107–111.
- Ulfendahl, M., Scarfone, E., Flock, A., Calvez, S. L., und Conradi, P. (2000). Perilymphatic fluid compartments and intercellular spaces of the inner ear and the organ of corti. *NeuroImage*, 12(3):307 – 313.
- v. Békésy, G. (1932). Zur theorie des hörens bei der schallaufnahme durch knochenleitung. *Annalen der Physik*, 405(1):111–136.
- Van Camp, G. und Smith, R. (2013). Hereditary hearing loss homepage.
- Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P. K., Hughes, D. C., Schattelman, I., Verstreken, M., Van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., Smith, R. J., Somers, T., Offeciers, F. E., Van de Heyning, P., Richardson, G. P., Wachtler, F., Kimberling, W. J., Willems, P. J., Govaerts, P. J., und Van Camp, G. (1998). Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet*, 19(1):60–2.
- Weaver, S. P. und Schweitzer, L. (1994). A radial gradient of fibril density in the gerbil tectorial membrane. *Hear Res*, 76(1-2):1–6.
- Wikström, K., Kjellström, G., und Obrink, B. (1996). Homophilic intercellular adhesion mediated by c-cam is due to a domain 1 - domain 1 reciprocal binding. *Exp Cell Res*, 227(2):360–366.
- Williams, A. F. und Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, 6:381–405.
- Yamashita, H., Sekitani, T., und Bagger-Sjöbäck, D. (1992). Expression of carbonic anhydrase isoenzyme-like immunoreactivity in the limbus spiralis of the human fetal cochlea. *Hearing Research*, 64(1):118 – 122.

- Yang, T., Pfister, M., Blin, N., Zenner, H. P., Pusch, C. M., und Smith, R. J. (2005). Genetic heterogeneity of deafness phenotypes linked to *dfna4*. *Am J Med Genet A*, 139(1):9–12.
- Zahmert, T. (2011). The differential diagnosis of hearing loss. *Dtsch Arztebl Int*, 108(25):433–43;.
- Zebhauser, R., Kammerer, R., Eisenried, A., McLellan, A., Moore, T., und Zimmermann, W. (2005). Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine cea family. *Genomics*, 86(5):566–80.
- Zebhauser, R. A. (2006). *Charakterisierung eines Mausmodells für die Evaluierung neuer Mitglieder der CEA-Familie als mögliche Zielstrukturen für die Tumorthherapie*. Dissertation, Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Zenner, H. P., Zimmermann, U., und Schmitt, U. (1985). Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear Res*, 18(2):127–33.
- Zheng, J., Miller, K. K., Yang, T., Hildebrand, M. S., Shearer, A. E., DeLuca, A. P., Scheetz, T. E., Drummond, J., Scherer, S. E., Legan, P. K., Goodyear, R. J., Richardson, G. P., Cheatham, M. A., Smith, R. J., und Dallos, P. (2011). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (*dfna4*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(10):4218–23.
- Zheng, J., Shen, W., He, D. Z., Long, K. B., Madison, L. D., und Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405(6783):149–55.
- Zhou, H., Fuks, A., Alcaraz, G., Bolling, T., und Stanners, C. (1993). Homophilic adhesion between ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. *The Journal of Cell Biology*, 122(4):951–960.
- Zhou, J., Zhang, L., Gu, Y., Li, K., Nie, Y., Fan, D., und Feng, Y. (2011). Dynamic expression of ceacam7 in precursor lesions of gastric carcinoma and its prognostic value in combination with cea. *World Journal of Surgical Oncology*, 9(1):172.
- Zimmermann, W. (2015). the carcinoembryonic antigen homepage. <http://www.carcinoembryonic-antigen.de>.
- Zimmermann, W., Weber, B., Ortlieb, B., Rudert, F., Schempp, W., Fiebig, H. H., Shively, J. E., von Kleist, S., und Thompson, J. A. (1988). Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res*, 48(9):2550–4.
- Zwislocki, J. J. (1986). Analysis of cochlear mechanics. *Hear Res*, 22:155–69.

# Abkürzungen

A	Adenin
ad	aufgefüllt auf
AK	Antikörper
AP	humane plazentare alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	<i>CEA-related cell-cell adhesion molecule</i> , CEA-verwandtes Zelladhäsionsmolekül
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO	Corti-Organ
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DFN	<i>Deafness</i> , Locus genomischer Taubheit mit x-chromosomaler Vererbung
DFNA	Locus genomischer Taubheit mit autosomal-dominanter Vererbung
DFNB	Locus genomischer Taubheit mit autosomal-rezessiver Vererbung
DFNX	Locus genomischer Taubheit mit x-chomosomaler Vererbung
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
et al.	<i>et alia</i> (und andere)
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FDU	FastDigest®Unit, Einheit eines bestimmten Enzymes
g	Gramm
G	Guanin
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HC	Hensen-Zellen

hCC16	humanes CEACAM16
HE	Hämatoxilin-Eosin, Färbemethode
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i> , humane Nierenzelllinie
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HZ	Haarzellen
ID	Interdentalzellen
Ig	Immunglobulin
IgC-Domäne	konstante ( <i>constant</i> ) Immunglobulindomäne
IgV-Domäne	variable Immunglobulindomäne
IHC	<i>inner hair cells</i> , Innere Haarzellen
IPC	<i>inner pilar cells</i> , Innere Pfeilerzellen
IST	Innerer Spiralsulcus
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
L	<i>Limbus spiralis</i>
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i> , Bakteriennährmedium
M	Molar
mCC16	murines CEACAM16
MEM NEAA	<i>MEM Non-Essential Amino Acids Solution</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
mg	Miligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSHL	<i>non-syndromic hearing loss</i> , nichtsyndromale Hörstörung
OHC	<i>outer hair cells</i> , Äußere Haarzellen
OPC	<i>outer pilar cells</i> , Äußere Pfeilerzellen
ORI	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
PH	innere Phalangealzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PSG	<i>pregnancy specific glycoprotein</i> , schwangerschaftsspezifische Glykoproteine
RIN	<i>RNA integrity number</i> , Maß für die Intaktheit der RNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rcf	relative centrifugal force, relative Zentrifugalbeschleunigung
RM	Reissnermembran



RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium, Zellkulturmedium
s	Sekunden
SC	Stereozilien
SHL	<i>syndromic hearing loss</i> , syndromale Hörstörungen
SM	<i>scala media</i>
ST	<i>scala tympani</i>
StV	<i>stria vascularis</i>
SV	<i>scala vestibuli</i>
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> , Bakterienstamm
TM	Tektorisalmembran
U	<i>units</i> , Einheiten
U/min	Umdrehungen pro minute, Drehzahleinheit

# Danksagung

Zuallererst geht ein großer Dank an meinen Doktorvater PD Dr. Robert Kammerer für die nicht nur theoretische Betreuung, seine unendliche Geduld und sein Verständnis bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ein ebenso großer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann, der vor Ort für zahlreiche fachliche Diskussionen zur Verfügung stand und es immer wieder verstand mich zum Durchhalten zu motivieren. Darüber hinaus danke ich ihm herzlich für die Bereitstellung der durch ihn und seine Kooperationspartner entwickelten CEACAM16-Nullmutanten.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und dem Förderprogramm für Forschung und Lehre gilt mein Dank für die fachliche und materielle Förderung im Rahmen des Promotionsstudiengangs "Molekulare und Systembiologische Medizin".

Dr. Diethilde Theil danke ich für die freundliche Überlassung der histologischen Schnitte humaner Innenohren. Ebenso gilt mein Dank Dr. Darryl Hill für die Ergebnisse seiner Western Blot-Analysen. Bei Frau Prof. Dr. Barbara Walzog bedanke ich mich für die Zurverfügungstellung der HEK293T-Zelllinie.

Ein besonders Maß an Dank gilt Dr. Rainer Riesenberg für die praktische Unterstützung in allen Bereichen der experimentellen Tätigkeit und die vielen (nicht nur fachlichen) Ratschläge die ich von ihm mit auf meinen Weg bekommen habe. PD Dr. Alexander Buchner, PD Dr. Heike Pohla, Birgit Stadelbauer, Heidi Baumhardt, Laura Brickner, Kathrin Weick, Tobias Müller und besonders meiner Mitdoktorantin Carina Welte danke ich für die Unterstützung, die freundliche Aufnahme und die gute Stimmung in den Zeiten der aktiven Laborarbeit. Mein besonderer Dank gilt auch Sarah Untiet, denn sie brachte mich dazu dieses Projekt anzugehen. Andreas Hackert danke ich für die (auch buchstäbliche) Unterstützung "auf den letzten Metern" dieser Arbeit.

Ein großes und herzliches Dankeschön geht an meinen Bruder Hanno und meine liebe Freundin Maren Schwarz, die mich durch die Zeit des Studiums und der Promotion begleitet, beraten, unterstützt, motiviert und letztendlich auch ertragen haben. Sie haben mir immer geholfen an ein gutes Ende zu glauben und mich bei Rückschlägen darin bestärkt weiterzumachen.

Zum Schluss gilt meine größte Dankbarkeit meinen Eltern. Sie haben mich angespornt nicht aufzugeben, Verständnis aufgebracht und durch ihre maßlose Unterstützung in allen Bereichen (nicht nur) diese Arbeit möglich gemacht. Vielen Dank.

## Eidesstattliche Versicherung

**Kamp, Annegret**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Untersuchungen zur Lokalisation und molekularen Interaktion von CEACAM16,  
einem hochkonservierten Mitglied der CEA-Familie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und  
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als  
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle  
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in  
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades ein-  
gereicht wurde.

München, den 22.10.2015

---

Ort, Datum

---

Unterschrift